



PERINNÖLLINEN HEMOKROMATOOSI

HFE-geenin C282Y- ja H63D -mutaatioiden osoitusmenetelmän koekäyttö, optimointi ja työohjeen laadinta

Paavo Hannus

Juha Tasso

Opinnäytetyö
Lokakuu 2011
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Tampereen ammattikorkeakoulu

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU

Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
K08MBIOAN

HANNUS, PAAVO & TASSO, JUHA:

Perinnöllinen hemokromatoosi, HFE-geenin C282Y- ja H63D -mutaatioiden osoitusmenetelmän koekäyttö, optimointi ja työohjeen laadinta

Opinnäytetyö 57 s., liitteet 6 s.
Lokakuu 2011

Perinnöllinen hemokromatoosi on autosomissa periytyvä raudan imeytymishäiriö, jossa elimistöön kertyy ylimääräistä rautaa. Se aiheutuu yleisimmin HFE-geenissä tapahtuvista C282Y- ja H63D -mutaatioista, joissa emäsmuutokset tapahtuvat nukleotideissa 845 ja 187. Emäsmuutos nukleotidissa 845 (G845A) aiheuttaa kysteiinin korvautumisen tyrosiinilla aminohappopaikassa 282 ja emäsmuutos nukleotidissa 187 (C187G) aiheuttaa histidiinin korvautumisen asparagiinihapolla paikassa 63. Hemokromatoosia aiheuttavat mutaatiot osoitetaan usein polymeerasiketjureaktioon (PCR) perustuvilla menetelmillä, joissa tiettyä osaa geenistä monistetaan tunnettujen alukkeiden ja DNA:ta monistavan polymeerasientsyymien avulla. PCR-tuotteiden ja niihin lisättyjen restriktioentsyymien seosta inkuboidaan entsyymien vaatimissa lämpötiloissa. Mutaatiot aiheuttavat DNA:ssa restriktioentsyymien tunnistuskohtien häviämistä tai niiden lisääntymistä. Restriktioentsyymien pilkkomat DNA-jaksot saadaan esille agarosigeelielektroforeesilla.

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen ammattikorkeakoululle, jossa sen tuotoksena valmistunut työohje voidaan käyttää bioanalytiikan ja laboratorioalan koulutusohjelmien harjoitustöissä ja syventävillä opintojaksoilla. Opinnäytetyön tarkoituksena oli koekäyttää hemokromatoosia aiheuttavien mutaatioiden osoittamiseen käytettävä kaupallinen työohje, optimoida restriktiofragmenttien pituuspolymorfia-analyysiin perustuva menetelmä sekä laatia toimiva ja selkeä suomenkielinen työohje.

Koekäytön ja menetelmäoptimoinnin aikana havaitut alkuperäisen työohjeen epäjohdonmukaisuudet korjattiin ja menetelmä saatiin toimimaan toivotulla tavalla. Samalla menetelmään tehtiin muutoksia, jotka tuovat säästöjä reagenssikuluihin. Tuotoksena valmistui työohje, jonka avulla opiskelijat pystyvät itsenäisesti suorittamaan menetelmän eri vaiheet. Jatkotutkimuksena menetelmää voisi kehittää edelleen korvaamalla polymeerasientsyymien edullisemmalla vaihtoehdolla ja optimoimalla sille polymeerasiketjureaktio-ohjelma. Samalla menetelmän digestiovaiheessa voisi kokeilla lyhyempiä digestioaikoja.

Avainsanat: hemokromatoosi, HFE-geeni, mutaation osoitus, polymeerasiketjureaktio, työohje

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Technology
K08MBIOAN

HANNUS, PAAVO & TASSO, JUHA:

Hereditary haemochromatosis; Testing and Optimizing a Method for Detecting H63D and C282Y Mutations of the HFE-gene.

Bachelor's thesis 57 pages, appendices 6 pages.
October 2011

Hereditary haemochromatosis is an autosomal recessive disorder of iron metabolism in which the body accumulates too much iron. It is most commonly caused by two mutations in the HFE-gene, namely C282Y and H63D. Both of these mutations cause a single amino acid to be replaced with another one, resulting in a conformation change in the HFE-protein encoded by the gene. The mutations causing haemochromatosis are often detected with a process called restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP). The method is based on polymerase chain reaction (PCR), which amplifies the mutated part of a specific gene. A mutation can either create a new restriction enzyme recognition site, or delete one, and this can be detected after restriction enzyme digestion with gel electrophoresis.

This thesis was made for Tampere University of Applied Sciences, where the work instruction can be used in student laboratory practice. The aim of the study was to test an existing method for detecting the mutations, to optimize it and to establish a new, functioning and easy-to-use instruction in Finnish.

A few problems of the original instruction were corrected, and also some changes were made to it that will cut down reagent expenses. As a product of this thesis a new instruction was established that can be used by students to perform all stages of the method independently. The method could be developed further by replacing the polymerase enzyme with a less expensive one, and by optimizing a new polymerase chain reaction program for it. At the same time shorter incubation times could be tested in the restriction digestion.

Keywords: haemochromatosis, HFE-gene, mutation detection, polymerase chain reaction, work instruction

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	5
2 HEMOKROMATOOSI	6
2.1 Elimistön rauta ja sen metabolia	6
2.2 Tyypin 1 eli klassinen hemokromatoosi	8
2.3 Tyypin 2 eli juveniili hemokromatoosi	10
2.4 Tyypin 3 eli transferriniireseptori 2 -hemokromatoosi (TfR2)	11
2.5 Tyypin 4 hemokromatoosi eli ferroportiinitauti	11
2.6 Sekundaarisen hemokromatoosin syitä	12
2.7 Hemokromatoosin hoito	12
3 RESTRIKTIOENTSYYMIANALYYSSIN MENETELMÄPERIAATTEET	14
3.1 Polymeraasiketjureaktio	14
3.2 Restriktioentsyymidigestio	17
3.3 Elektroforeesi	19
4 TYÖOHJEEN TUOTTAMINEN TOIMINTATUTKIMUKSENA	23
4.1 Toiminnallinen tutkimus	23
4.2 Kokeellinen tutkimus	24
5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT	25
6 TYÖOHJEEN KOEKÄYTTÖ	26
6.1 Suoritus	27
6.2 Tulokset	31
7 MENETELMÄN OPTIMOINTI	34
7.1 Restriktioentsyymien vaihto	34
7.2 Mutaatiot näytteissä	36
7.3 Polymeraasientsyymien vaihto	38
8 TUOTOKSEN KUVAUS	42
9 POHDINTA	45
LÄHTEET	48
LIITTEET	52

1 JOHDANTO

Hemokromatoosi on perinnöllinen sairaus, jossa elimistöön kertyy ylimääräistä rautaa, joka aiheuttaa lopulta kudosisvaurioita esimerkiksi haimassa, maksassa ja sydänlihaksessa (Hannuksela, Färkkilä & Parkkila. 2008, 1019). Tavallisesti syynä tähän ovat mutaatiot HFE -geenissä. Geenimutaatio aiheuttaa suolen seinämän soluissa muutoksen, joka lisää raudan imeytymistä elimistöön. (Mustajoki 2009.) Hemokromatoosin diagnostiikassa tärkeänä tutkimuksena käytetään polymeraasiketjureaktioon eli PCR -tekniikkaan perustuvaa HFE -genotyyppitystä (Laboratoriokeskus ohjekirja, 2006). Kliinisessä käytössä olevasta menetelmästä on olemassa myös molekyylibiologian harjoitustöihin sopiva sovellus.

Opinnäytetyönämme testaamme Promega Corporationin sovelluksesta laatiman työohjeen ja optimoimme sen Tampereen ammattikorkeakoulun molekyylibiologian harjoitustöihin. Harjoitustyöt tähtäävät opettamaan opiskelijoille molekyylibiologian perusmenetelmien hallintaa teorian ja käytännön tasolla. Työn aiheena on perinnöllinen hemokromatoosi – HFE-geenin C282Y- ja H63D-mutaatioiden osoitusmenetelmän koeikäyttö, optimointi ja työohjeen laadinta. Työ käsittelee hemokromatoosia, sen tutkimista, taudinkuvaa ja hoitoa sekä tarkemmin yleisimpien sitä aiheuttavien mutaatioiden molekyylibiologista osoittamista. Hemokromatoosin tutkimisessa käytetään ensisijaisesti rauta-aineenvaihduntaan liittyviä kliinisen kemian tutkimuksia, mutta rajasimme työomme koskemaan pääsääntöisesti perinnöllistä hemokromatoosia ja sitä aiheuttavien mutaatioiden osoittamista harjoitustöihin sopivalla menetelmällä. Käytettävä menetelmä pitää sisällään geenimonistuksen polymeraasiketjureaktiolla (PCR), restriktiofragmenttien pituuspolymorfia-analyysin (RFLP) ja agarosigeelielektroforeesin (AGE).

Opinnäytetyön aihe on saatu Tampereen ammattikorkeakoulun lehtori FT Tuuli Välinevalta, joka testasi Promega Corporationin menetelmän kerran. Työohjeessa esiintyi tällöin ongelmia, jotka olisivat voineet hankaloittaa sen käyttöä harjoitustöissä. Tästä havainnosta seurasi tarve ohjeen uudistamiseen. Laadimme uuden mutaatioiden osoittamiseen käytettävän työohjeen kliinisten laboratorioiden laatustandardien mukaisesti käyttämällä apuna alkuperäistä työohjetta sekä oman koekäytön ja optimoinnin aikana saatuja tuloksia.

2 HEMOKROMATOOSI

Perinnöllinen hemokromatoosi on autosomissa eli kromosomissa, joka ei ole sukupuolikromosomi, resessiivisesti periytyvä sairaus. Hemokromatoosissa elimistöön varastoituu rautaa moninkertaisesti normaaliin verrattuna. (Ruutu, Rajamäki, Lassila & Porkka 2007, 165.) Hemokromatoosi jaetaan neljään alaluokkaan, joissa taudin syynä ovat mutaatiot eri geeneissä. Sen alaluokat ovat tyypin 1 eli klassinen hemokromatoosi, tyypin 2 eli juveniili hemokromatoosi, tyypin 3 eli TfR2-hemokromatoosi ja tyypin 4 hemokromatoosi eli ferroportiinitauti. (Hannuksela ym. 2008, 1019.) Yleisimmin perinnöllinen hemokromatoosi aiheutuu HFE-geenissä (hemochromatosis gene) tapahtuvista H63D- ja C282Y-mutaatioista (Barton & Edwards 2000, 9–10). H63D-mutaatiossa histidiini on vaihtunut asparagiinihapoksi HFE-geenin koodaaman proteiinin aminohappopaikassa 63 ja C282Y-mutaatiossa kysteiini on vaihtunut tyrosiiniksi aminohappopaikassa 282 (Killeen 2001, 439–440).

2.1 Elimistön rauta ja sen metabolia

Raudan kokonaismassamäärä aikuisen miehen kehossa on noin neljä grammaa ja naisella noin 2–3 grammaa, josta noin 65–70% on sitoutuneena hemoglobiiniin ja noin 20–25% on varastoituna pernaan, maksaan ja luuytimen. Suurin osa lopusta elimistön raudasta (noin 10%) on myoglobiinissa ja muissa hemoproteiineissa. Ainoastaan 0,1% kehon raudan kokonaismäärästä on plasmassa, jossa lähes kaikki rautamolekyylit ovat sitoutuneet kuljettajaproteiiniin transferriniin. (Marshall & Bangert 2004, 314–315; Kaplan & Pesce 2010, 756.) Rauta imeytyy elimistöön ohutsuolen alkuosan ja pohjukaissuolen kautta ja ruoan mukana saatu Fe^{3+} -muotoinen rauta muutetaan paremmin imeytyvään Fe^{2+} -muotoon. Fe^{3+} muutetaan raudan reduktiaasi- eli pelkistäjäentsyymien avulla suoliston seinämällä Fe^{2+} -muotoon, jonka jälkeen DMT1 (Divalent Metal Transporter) kuljettaa rautaioneita limakalvon soluihin. (Kaplan & Pesce 2010, 756.) Täältä rauta siirretään suoraan verenkiertoon tai se yhdistyy rautaa sitovan proteiinin apoferritiinin kanssa muodostaen ferritiinimolekyylin (Marshall & Bangert 2004, 316). Ennen Fe^{2+} -ionien siirtymistä verenkiertoon ne hapetetaan takaisin Fe^{3+} -muotoon ferroportiinin ja kuparia sisältävän proteiinin (hephaestin) yhteistyöllä (Kaplan & Pesce 2010, 756).

Rautavarastojen ollessa niukat, ravinnon raudasta imeytyy elimistöön tavanomaista suurempi osa. Rautavarastojen taas kasvaessa, raudan imeytyminen vähenee. (Ruutu ym. 2007, 162–163.) Raudan imeytymisen säätelyn ajatellaan tapahtuvan ohutsuolen kryptien alueella sijaitsevilla epäkypsillä enterosyyteillä sekä maksassa. Arvellaan, että kryptan epäkypsät enterosyytit mittaavat verenkierrossa kulkevan raudan määrää. Solujen kypsyttyä ja siirryttyä villusten kärkeisiin ne pystyvät huolehtimaan raudan imeytymistä elimistön vaatimusten mukaan. (Hannuksela ym. 2008, 1019.) Myös maksa osallistuu keskeisesti raudan imeytymisen säätelyyn suolistossa. Maksan erittämä peptidi hepsidiini välittää rautavarastojen täytyessä raudan imeytymistä vähentävän viestin suolistolle. (Ruutu ym. 2007, 162–163.) Rautaa erittyy ulosteisiin vähäisten verenvuotojen yhteydessä sekä kuolleiden ohutsuolen solujen ja sapen mukana. Miehillä erittyy rautaa vuorokaudessa noin 1mg ja hedelmällisessä iässä olevilla naisilla erittyy myös kuukautisten mukana rautaa, jonka vuoksi raudan keskimääräinen erityös on hieman enemmän vuorokaudessa (noin 1,3mg). (Voutilainen 2009, 63.)

Normaali raudan konsentraatio plasmassa on aikuisella 9–34µmol/l ja lapsilla 6–25 µmol/l (Laboratoriokeskus ohjekirja 2008). Plasman ja seerumin rautakonsentraatio voi vaihdella suuriakin määriä eri kellonaikoina ja päivinä. Raudan metaboliaa tutkittaessa plasman rautakonsentraatio on merkittävä lähinnä jos epäillään hemokromatoosia tai rautamyrkytystä. (Marshall & Bangert 2004, 316; Kaplan & Pesce 2010, 761.) Transferriini on keskeisin rautaa plasmassa kuljettava proteiini. Elimistö pyrkii pitämään plasman ja seerumin rautakylläisyyden 30–35%:ssa raudan sitomisen kokonaiskapasiteetista (total iron binding capacity eli TIBC). Rautakylläisyys pyrkii suurenemaan aterioiden jälkeen, joka johtuu ravinnosta imeytyvästä raudasta. Pienikin raudanpuute vähentää plasman ja seerumin rautapitoisuutta ja johtaa transferriinisynteesin kiihtymiseen ja transferriinipitoisuuden suurenemiseen. (Ruutu ym. 2007, 163.)

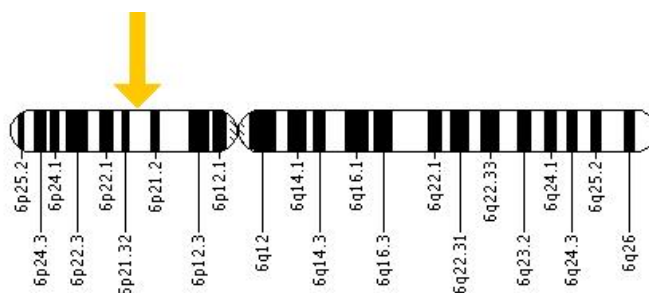
Transferriinin ja raudan kompleksi siirtyy verenkierrosta punasolujen esiasteisiin dimeerirakenteisten transferriinireseptorien (TfR) välityksellä, jotka ovat solujen pinnalla. Yksi transferriinireseptori voi sitoa kaksi rauta-atomia. Transferriinireseptorin solukalvon ulkopuolinen osa irtoaa ja kulkeutuu verenkiertoon punasolun kypsyessä, joten kypsissä punasoluissa ei ole transferriinireseptoreita. Punasolujen esiasteissa tapahtuva transferriinireseptorisynteesi kiihtyy, kun hemoglobiinisynteesiin käytettävät rautamäärät vähenevät. Plasman TfR-pitoisuus suurenee huomattavasti rautavarastojen ehdyttyä. Suurin osa elimistön TfR:stä on luuytimen punasoluja tuottavassa solukossa, jonka

vuoksi plasman ja seerumin TfR pitoisuudet heijastavat punasolutuotannon kokonaismäärässä tapahtuvia muutoksia. Transferriinireseptorimäärityksiä käytetään raudanpuuteanemian ja sekundaarianemian erotusdiagnostiikassa. (Ruutu ym. 2007, 164–165.)

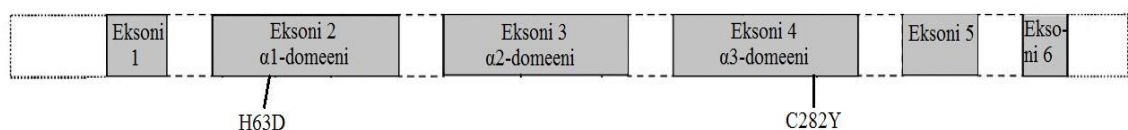
Rauta-aineenvaihduntaan osallistuu myös toinen transferriiniä sitova reseptori transferriinireseptori-2 (TfR2). Sen merkitystä ei täysin tunneta rautatasapainon säätelyssä, mutta reseptorin ominaisuudet eroavat melko paljon aiemmin tunnetusta TfR-muodosta. TfR2:sta ei ole olemassa liukoista muotoa, jota voisi mitata esimerkiksi plasmasta, ja siitä puuttuvat rakenneosat, joita raudan määrä suoranaisesti säätelee. (Ruutu ym. 2007, 165.)

2.2 Tyypin 1 eli klassinen hemokromatoosi

Klassinen hemokromatoosi aiheutuu kromosomissa 6 sijaitsevan HFE-geenin (kuvio 1) C282Y-, H63D- ja S65C-mutaatioista. HFE-geenin eksonissa 2 oleva H63D-mutaatio tarkoittaa sytosiiniemäksen vaihtumista guaniiksi nukleotidissa 187 (C187G), jonka johdosta asparagiinihappo korvaa histidiinin aminohappopaikassa 63 (kuvio 2). HFE-geenin eksonissa 4 tapahtuva C282Y-mutaatio taas tarkoittaa guaniiniemäksen vaihtumisen adeniiniksi nukleotidissa 845 (G845A), jonka vuoksi kysteiini vaihtuu aminohappopaikassa 282 tyrosiiniksi (kuvio 2). (Killeen 2001, 439–440.)



KUVIO 1. HFE-geenin sijainti kromosomissa 6 paikassa 21.3. (U.S. National Library of Medicine 2009)



KUVIO 2. Perinnöllistä hemokromatoosia aiheuttavien H63D- ja C282Y-mutaatioiden sijainnit HFE-geenissä. (Aguilar-Martinez ym. 2011, muokattu)

Fysiologisissa olosuhteissa HFE-geenin koodaama HFE-proteiini sitoutuu transferiinireseptoriin (TfR) ja β_2 -mikroglobuliiniin. Näiden sitoutuminen toisiinsa on raudan TfR-välitteisen kuljetuksen kannalta välttämätön edellytys oikean rautamäärän imeytymiselle elimistön tarpeiden mukaisesti. C282Y-mutaatio häiritsee disulfididista HFE-proteiinin α -3-domeenissa, joka on tärkeä toiminnallinen osa β_2 -mikroglobuliinin ja proteiinin yhteistyössä. (Hannuksela ym. 2008, 1020; Killeen 2001, 439.) Yleisimmin perinnöllinen hemokromatoosi aiheutuu C282Y-mutaatiosta HFE-geenin molemmissa alleeleissa homotsygoottisena (Hannuksela ym. 2008, 1021).

Toinen HFE-geenin mutaatio, joka aiheuttaa perinnöllistä hemokromatoosia on C282Y/H63D-yhdistelmäheterotsygotia. Tässä mutaatiossa HFE-geenin toisesta alleelistä löytyy C282Y-mutaatio ja toisesta H63D-mutaatio. Tämän mutaation omaavalla henkilöllä ei raudan imeytyminen elimistöön ole yhtä runsasta kuin homotsygootti C282Y-mutaation omaavalla. On havaittu myös S65C-mutaation aiheuttavan C282Y-mutaation kanssa (C282Y/S65C-yhdistelmäheterotsygotia) lievää raudan kertymistä elimistöön, joka voi joskus johtaa taudin kehittymiseen. (Hannuksela ym. 2008, 1021; Killeen 2001, 440). Yhteenvetona siis genotyypit C282Y/C282Y, C282Y/H63D ja C282Y/S65C HFE-geenissä aiheuttavat henkilölle perinnöllistä hemokromatoosia (Parkkila 2004). Homotsygootti H63D-mutaatio aiheuttaa hemokromatoosia ainoastaan kun henkilöllä on muita tauteja, kuten alkoholin aiheuttama maksatauti tai C-hepatiitti (Alexander & Kowdley 2005, 240).

Klassisen hemokromatoosin löydökset ja oireet ovat hyvin epäspesifisiä taudin alkuvaiheessa, mutta taudin edetessä henkilölle alkaa ilmentyä hemokromatoosille tyypillisiä kliinisiä oireita (Hannuksela ym. 2008, 1020). Yleensä hemokromatoosi aiheuttaa terveyshaittoja vasta aikuisena 30 ikävuoden jälkeen, vaikka se onkin perinnöllinen sairaus. Rautaa kertyy maksan parenkyymisoluihin, altistaen maksakirroosin kehittymiselle. Lisäksi rautaa kertyy esimerkiksi haimaan, pernaan, sydämeen, ihoon ja sukupuolirauhasiin. Haimakertymä voi aiheuttaa diabetestä, ihokertymä saattaa aiheuttaa hyperpigmentaatiota, sydänkertymä voi aiheuttaa kardiomyopatiaa eli sydänlihaskvauriota, pernaan kertyminen voi aiheuttaa splenomegaliaa eli pernan suurentumista ja sukupuolirauhasiin kertyminen saattaa aiheuttaa hypogonadismia eli sukupuolirauhasten vajaatoimintaa. (Ruutu ym. 2007, 163; Hannuksela ym. 2008, 1020–1022.)

Klassisen hemokromatoosin yleisimpinä oireina ovat väsymys, heikkouden tunne ja nivelkivut. Tavallisina oireina on myös seksuaalinen haluttomuus, impotenssi ja ylävatsakivut. Ylimääräisen raudan imeytymisen elimistöön kertoo ensimmäisenä plasman tai seerumin transferriinin rautakyllästeisyyden (S/P-TrFeSat) suureneminen. Taudin varhaisessa vaiheessa myös seerumin ferritiinipitoisuus (S-Ferrit) suurenee ja se kuvastaa yleensä hyvin elimistön rautavarastojen määrää. Ferritiinin pitoisuus saattaa kasvaa tosin myös infektioiden ja maksavaurion yhteydessä, koska se on akuutin vaiheen proteiini. Elimistön ylimääräinen rauta kertyy ensimmäisenä maksaan, joka voi aiheuttaa seerumin alaniiniaminotransferaasin (ALAT) ja aspartaattiaminotransferaasin (ASAT) arvojen nousua ja johtaa lopulta maksafibroosin ja maksakirroosin kehittymiseen. (Hannuksela ym. 2008, 1021.) Hemokromatoosia epäiltäessä on myös hyvä tutkia transferriinivot, sillä se on maksassa syntetisoituva proteiini, jonka tehtävänä sitoa ja kuljettaa rautaa (Laboratoriokeskus ohjekirja 2008). Diagnoosi voidaan varmistaa vielä maksabiopsialla tai maksan magneettikuvauksella, jolloin saadaan myös tietoa mahdollisesta rautakertymästä. Lopullinen ja varma diagnoosi tehdään polymeraasiketjureaktioon perustuvalla mutaatioiden osoitusmenetelmällä. (Hannuksela ym. 2008, 1025–1026).

2.3 Tyypin 2 eli juveniili hemokromatoosi

Juveniilissa hemokromatoosissa kliinisiä komplikaatioita kehittyy jo ennen 30 vuoden ikää. Tyypillistä tämän tyypin hemokromatoosille on raudan nopea kertyminen elimistöön. Seerumin ja plasman transferriinin rautakyllästeisyys sekä seerumin ferritiinivot kohoavat. Taudin kliiniset oireet ovat samat kuin klassisessa hemokromatoosissa. Juveniilissa hemokromatoosissa kuitenkin kardiomyopatia, hypogonadismi ja diabetes ovat huomattavasti yleisempiä kuin klassisessa. (Hannuksela ym. 2008, 1021–1022; Goldberg 2005.)

Juveniili hemokromatoosi voi aiheutua HAMP-geenin (hepcidin antimicrobial peptide-gene) tai HJV-geenin (hemojuvenil-gene) mutaatioista. HAMP-geeni koodaa hepsidiiniproteiinia, jolla on keskeinen asema rauta-aineenvaihdunnan säätelyssä, ja HJV-geeni koodaa hemojuveniili-nimistä proteiinia, joka vaikuttanee rauta-aineenvaihduntaan hepsidiiniproteiinin kautta. Nämä mutaatiot aiheuttavat maksan tuottaman hepsidiinipitoisuuden pienenemistä, jonka johdosta raudan imeytyminen ja vapautuminen retikuloen-

doteliaalijärjestelmästä eli elimistön syöjäsolujärjestelmästä lisääntyy. (Hannuksela ym. 2008, 1022; Alexander & Kowdley 2005, 242.)

2.4 Tyypin 3 eli transferriinireseptori 2 -hemokromatoosi (TfR2)

Tyypin 3 hemokromatoosi on harvinainen perinnöllinen sairaus joka aiheutuu TfR2-geenin mutaatioista. Seerumin rauta-arvojen suureneminen, raudan kertyminen maksaan ja kliiniset komplikaatiot ovat samanlaisia kuin klassisessa hemokromatoosissa. Oireet kuitenkin ilmenevät yleensä varhaisemmalla iällä kuin hemokromatoosin klassisessa muodossa. Maksan hepatosyyteissä ilmentyvä TfR2-proteiinin rooli rauta-aineenvaihdunnassa on epäselvä, mutta se saattaa osallistua transferriiniin sitoutuneen raudan solunottoon reseptori-endosytoosivälitteisellä mekanismilla. (Hannuksela ym. 2008, 1022; Camaschella & Roetto 2005.)

2.5 Tyypin 4 hemokromatoosi eli ferroportiinitauti

Ferroportiinitauti eroaa muista perinnöllisen hemokromatoosin muodoista, sillä se periytyy autosomissa dominoivasti SLC40A1-geenissä (solute carrier family 40), joka koodaa ferroportiini 1 -proteiinia. Ferroportiini on solukalvolla sijaitseva proteiini, jonka tehtävänä on kuljettaa rautaa hepsidiinin kanssa yhteistyössä solun ulkopuolelle. (Hannuksela ym. 2008, 1022; Whittington 2011.)

Ferroportiinitauti voidaan jakaa kahteen luokkaan mutaatiotyyppien mukaan. SLC40A1-geenin mutaatiot voivat estää ferroportiini 1-proteiinin siirtymisen solukalvolle, jolloin se ei pysty siirtämään rautaa solun ulkopuolelle esimerkiksi enterosyyteistä ja makrofageista, mikä aiheuttaa raudan kertymisen maksan retikuloendoteliaalijärjestelmään. Taudinkuvaan kuuluu seerumin ferritiinipitoisuuden kasvu raudan kudoksiin kertymisen vuoksi sekä plasman tai seerumin transferriinin rautakylläisyyden lievä nousu tai sen pysyminen normaalina. Vasta taudin myöhemmässä vaiheessa transferriinin rautakylläisyys kasvaa selvemmin ja parenkymaalisiin elimiin alkaa kertyä rautaa. (Hannuksela ym. 2008, 1022; Alexander & Kowdley 2005, 243.)

Toisenlainen SLC40A1-mutaatio aiheuttaa klassisen hemokromatoosin kaltaisen sairauden. Tällöin mutatoitunut ferroportiini 1-proteiini sijaitsee normaalisti solukalvolla, mutta se ei reagoi hepsidiinin vaikutukseen, jolloin rautaa kulkeutuu tavallista enemmän ulos enterosyyteistä ja makrofageista. Tämän johdosta rautaa kertyy hepatosyytteihin, seerumin ferritiinipitoisuus ja plasman/seerumin transferriini rautakylläisyys suurenee kuten klassisessa hemokromatoosissa. (Hannuksela ym. 2008, 1023.)

2.6 Sekundaarisen hemokromatoosin syitä

Raudan kertymistä elimistöön voivat aiheuttaa myös anemiat, kuten talassemia ja sideroblastianemia. Verensiirroissa ja ruokatottumuksien vuoksi rautaa voi kertyä elimistöön liikaa aiheuttaen hemokromatoosia. Lisäksi krooniset maksasairaudet, kuten hepatiitti C, alkoholikirroosi sekä muu kuin alkoholista johtuva steatohepatiitti eli rasvamaksa (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) saattavat aiheuttaa hemokromatoosia. (Hannuksela ym. 2008, 1021.)

2.7 Hemokromatoosin hoito

Hemokromatoosin hoidon kulmakivenä on venesektio eli veren laskeminen pois elimistöstä. Hoito voidaan suorittaa maksimissaan kerran viikossa, jolloin potilas ei tule aneemiseksi. Venesektiolla poistetaan elimistöstä 500ml verta jokaisella hoitokerralla, jolloin elimistöstä poistuu 200–250mg rautaa. (Marshall & Bangert 2004, 318–319; Ruutu ym. 2007, 166). Hemokromatoosin hoidon aloittamisen kriteerinä pidetään kun miehillä ferritiinipitoisuus ylittää 300µg/l ja naisilla 200µg/l (Barton & Edwards 2000, 329). Venesektiohoitoja jatketaan, kunnes seerumin ferritiinipitoisuus on alle 50µg/l ja transferriinin rautakylläisyys alle 30%, jonka jälkeen hoitoja tarvitaan kahdesta neljään kertaa vuodessa estämään raudan kertymistä uudelleen elimistöön (Alexander & Kowdley 2005, 245). Venesektiohoidon vasta-aiheita ovat esimerkiksi vaikeat anemiat, sydänoireet tai hypoproteinemia eli alhainen proteiinimäärä veressä (Hannuksela ym. 2008, 1026).

Hemokromatoosin hoito tulisi aloittaa jo ennen elinvaurioiden syntyä välttämällä runsaasti rautaa sisältävää ravintoa. Hoitona voidaan käyttää myös deferoksamiinihoitoa,

jolla elimistöstä saadaan poistumaan 50–150mg rautaa kuukaudessa. (Ruutu ym. 2007, 165–166.) Deferoksamiini kelatoi rautaa ja kuljettaa sitä virtsan mukana pois elimistöstä (Duodecim terveyskirjasto 2011).

3 RESTRIKTIOENTSYYMIANALYYSIN MENETELMÄPERIAATTEET

Mutaatioiden osoittamiseen on olemassa useita erilaisia menetelmiä. Tuntematon mutaatio voidaan osoittaa DNA-jakson sekvensoinnilla eli selvittämällä emäsjärjestys tietyssä geenissä. Hybridisaatiotekniikassa denaturoitu näyte-DNA kiinnittyy sille komplementaariseen leimattuun vastinjuosteeseen. Mutaationosoituksessa näytteen mutaatio estää tai aiheuttaa tämän kiinnittymisen. Hybridisaatiomenetelmistä on olemassa myös mikrosirusovelluksia. Suuri osa mutaationosoitusmenetelmistä perustuu polymeerasiketjureaktioon ja sen pohjalta on kehitetty lukuisia käyttösovelluksia. (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2010, 153, 177, 193, 206.) HFE-geenin mutaatioiden osoitukseen käytettävässä menetelmässä ensimmäinen vaihe on polymeerasiketjureaktio, joka monistaa HFE-geenin ne kaksi eksonia, joilla mahdolliset mutaatiot sijaitsevat. Monistustuotteet pilkotaan mutaatioalueelta restriktioendonukleaaseilla, jolloin menetelmästä ja mutaatiosta riippuen restriktioentsyymille on muodostunut tai siltä on kadonnut tunnistuskohta. Lopuksi restriktiotuotteet analysoidaan agarosigeelielektroforeesilla. Elektroforeesi kertoo onko näytteessä kyseistä mutaatiota ja lisäksi mutaation tapauksessa sen avulla voidaan erottaa sen hetero- ja homotsygoottimuodot.

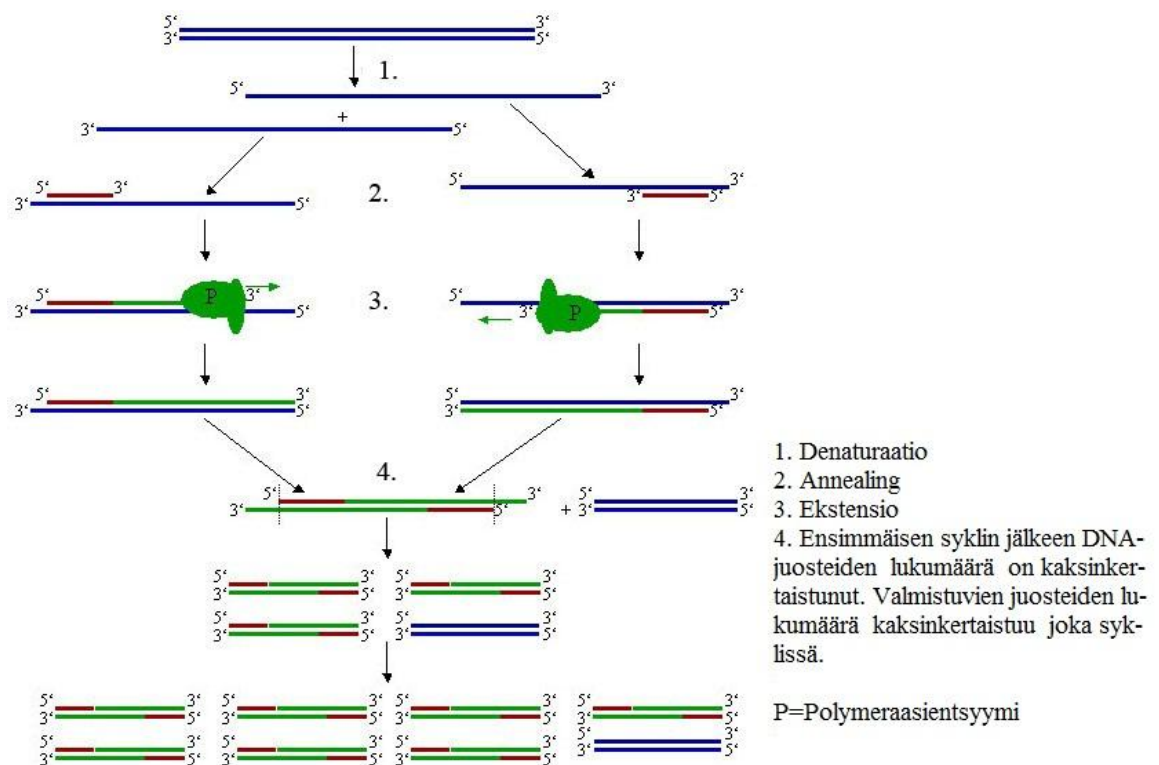
3.1 Polymeerasiketjureaktio

Polymeerasiketjureaktio eli PCR on yksinkertainen ja nopea tapa valmistaa lukemattomia kopioita halutusta nukleiinihapposekvenssistä. Kahden tunnetun emäsjakson välissä oleva 100–35000 emäsparin suuruinen alue saadaan monistettua ja monistustuotetta voidaan käyttää sellaisenaan esimerkiksi tietyn taudin mutaatiodiagnostiikkaan. (Glick, Patten & Pasternak 2010, 109.)

PCR:ssä on kolme eri vaihetta, denaturaatio, annealing ja ekstensio, joista kussakin on oma reaktiokohtainen aikansa ja lämpötilansa. Reaktion ensimmäinen vaihe eli denaturaatio irrottaa templaatti-DNA:n juosteet toisistaan kun lämpötila nousee yli 90°C:een. Toisessa vaiheessa eli annealingissä lämpötila lasketaan alukkeiden sulamislämpötilasta riippuen välille 40–60°C, jolloin alukkeet kiinnittyvät templaatti-DNA:n spesifisiin sitoutumiskohtiin. Polymeerasientsyymi alkaa syntetisoida templaatti-DNA:lle komplementaarista DNA:ta ekstensiovaiheessa kun lämpötila nostetaan käytettävän polyme-

raasientsyymien optimaaliseen toimintalämpötilaan. Yleisin käytetty polymeerasientsyymi on termofiilisen *Thermus aquaticus*-bakteerin *Taq*-polymeeraasi, jonka lämpötilaoptimi on 72°C. Tämä kolmen vaiheen sykli toistetaan tavallisesti noin 30 kertaa. (Wilson & Walker 2005, 209–210.) PCR:n toteutukseen käytetään siihen suunniteltua laitetta, joka vaihtaa reaktioseosten lämpötilat nopeasti ja tarkasti (Suominen ym. 2010, 153).

Ensimmäisen syklin jälkeen templaatti-DNA:lle on muodostunut komplementaariset vastinjuosteet. Tällöin siis kahdesta DNA-nauhasta on muodostunut neljä DNA-nauhaa. Uudet vastinjuosteet ovat pidemmät kuin lopulliset monistustuotteet, sillä polymeerasientsyymi jatkaa uuden nauhan valmistusta seuraavaan denaturaatioon asti. Toisessa syklistä aikaisempien monistustuotteiden pohjalta tuotetut uudet DNA-nauhat ovat jo oikean pituisia, sillä niiden päät rajoittuvat alukkeiden mukaan. Toisen syklin jälkeen nauhoja on jo kahdeksan. Kolmannen syklin jälkeen nauhoja on muodostunut jo 16 kappaletta. PCR:n tuotteena syntyy syklien jälkeen miljoonia määrätyn pituisia DNA-juosteita. (Suominen ym. 2010, 154–156.)



KUVIO 3. DNA-templaatin monistus PCR:llä. (Rice 2011, muokattu)

Polymeraasiketjureaktioon tarvitaan monistettavaa templaatti-DNA:ta, joka sisältää ainakin kaksi tunnettua emäsjaksoa. Näiden kahden emäsjakson pohjalta syntetisoidaan oligonukleotidiprimereit, eli alukkeet, jotka ovat komplementaarisia templaatin halutuille alueille. Alukkeet on suunniteltava niin, että ne sitoutuvat spesifisesti vain haluttuihin kohtiin DNA:ssa. (Suominen ym. 2010, 154.) Alukkeiden tulee tästä syystä olla riittävän pitkät, mutta kustannussyistä ei liian. Tavallisesti alukkeet ovat pituudeltaan 18–30 emästä. Niiden suunnittelussa tulee kiinnittää huomiota guaniinin ja sytosiinin määrään alukkeissa. Sen tulee olla riittävän suuri, jotta alukkeet ehtivät kiinnittyä templaattiin ennen DNA:n renaturoitumista ja niiden määrä tulee olla suunnilleen sama molemmissa alukkeissa, jotta niiden sulamislämpötilat olisivat samat. Sulamislämpötila on lämpötila, jossa puolet alukkeista on kiinnittyneinä templaattiin ja puolet irrallaan liuoksessa. Sulamislämpötilan karkeaan laskemiseen manuaalisesti on olemassa kaava sekä ilmaisia tietokoneohjelmia, mutta kaupallisesti toimitettavissa alukkeissa arvioitu sulamislämpötila on usein valmiiksi laskettuna. Lasketut sulamislämpötilat eivät kuitenkaan aina ole parhaita mahdollisia, vaan ne tulee varmistaa kokeellisesti. Alukkeet eivät saa myöskään olla toisilleen komplementaarisia ja niiden emäsjaksojen ei tulisi itsessään muodostaa sekundaarisia rakenteita kuten hiusneularakenteita. (Campbell & Farrell 2008, 388; Suominen ym. 2010, 158–159.)

Polymeraasiketjureaktion onnistumiseksi reaktioseoksessa on oltava hyvin tarkasti määritellyt olosuhteet. Polymeraasientsyymi on esimerkiksi magnesiumionikonsentraation suhteen herkkä ja se tulee aina optimoida kullekin templaatti-alkukeyhdistelmälle. (Suominen & Ollikka 2003, 110.) Magnesiumionit voivat toisinaan olla valmiiksi kaupalliseen reaktiopuskuriin sekoitettuna, jolloin valmistaja on optimoinut konsentraation kyseiselle reaktiolle. Usein polymeraasientsyymien kanssa toimitetaan sille optimoitu puskuriliuos, jossa magnesiumionikonsentraation lisäksi muun muassa pH ja KCl-konsentraatio on optimoitu valmiiksi (Promega Corporation 2011b). Polymeraasientsyymi tarvitsee uuden DNA-nauhan muodostamiseen vapaita nukleotidejä, jotka lisäävät reaktioseokseen. Jotta dNTP:ien (deoksiribonukleotiditriphosfaatti) määrä ei olisi reaktion rajoittavana tekijänä, niitä tulee olla seoksessa pienin mahdollinen ylimäärä. (Suominen ym. 2010, 162.)

Polymeraasiketjureaktiomenetelmät ovat hyvin herkkiä virheille ja kontaminaatiolle. Herkimmissä sovelluksissa yksikin reaktioon kuulumaton DNA-molekyyli voi kontaminoida reaktioseoksen, jolloin seurauksena voi olla epäspesifinen monistus. Tämän

vuoksi PCR:ssä tulisi käyttää vain siihen käytettäviä välineitä kuten pipettejä, sekä steriloituja putkia ja suodattimella varustettuja pipetinkärkiä. Useat polymeraasientsyymit ovat niin sanottuja hotstart-polymeraaseja, mikä osaltaan vähentää epäspesifistä monistumista. Hotstart-reaktioseoksessa entsyymi on inaktivoitu esimerkiksi kiinnittämällä se vasta-aineeseen. Tällöin polymeraasientsyymi saavuttaa aktiivisuutensa vasta alku-denaturaation aikana. (Promega Corporation 2011b; Suominen ym. 2010, 166; Wilson & Walker 2005, 212.) Suunniteltaessa PCR:n toteutusta tulee ottaa huomioon, miten mahdolliset virheet voidaan havaita. Tämän vuoksi reaktioiden yhteydessä tulee aina suorittaa myös tiettyjä kontroleja. Ainakin seos, jossa on templaatti mutta ei alukkeita, ja alukkeet, mutta ei templaattia tulisi sisällyttää, jolloin tuloksista voidaan helpommin selvittää missä kontaminaation lähde on (Suominen & Ollikka 2003, 109).

3.2 Restriktioentsyymidigestio

Restriktiofragmenttien pituuspolymorfia-analyysissä eli RFLP:ssä käytetään hyväksi yhtä tai useampaa restriktioentsyymiä mutaatioiden havaitsemiseksi. Analyysi perustuu siihen, että esimerkiksi pistemutaatio muuttaa DNA:sta jonkin restriktioentsyymin tunnistuskohdan, joko saaden aikaan uuden tai poistaen sellaisen määrättyä aluetta. Pilkotut tuotteet analysoidaan esimerkiksi agarosigeelielektroforeesilla, jolloin fragmenttien lukumäärästä voidaan havaita mutaation olemassaolo sekä hetero- tai homotsygotia. RFLP on yleisessä käytössä kliinisissä- ja tutkimuslaboratorioissa erityisesti pienten näytemäärien tapauksessa, sillä kun näytemäärät kasvavat, kustannukset verrattuna muihin menetelmiin kasvavat suuresti. Tämä johtuu siitä että menetelmä ei ole helposti automatisoitavissa. (Kaplan & Pesce 2010, 242.)

Restriktioendonukleasit ovat entsyymiryhmä, jotka pilkkovat nukleiinihappoja katalysoimalla nukleiinihappojen fosfodiesterisidosten hydrolyysiä. Eräät nukleasientsyymit ovat spesifisiä juuri DNA:lle, toiset RNA:lle. Eksonukleasit pilkkovat yksittäisiä nukleiinihappoja ketjun päästä, kun taas endonukleasit pilkkovat nukleiinihappoja ketjun keskeltä. (Campbell & Farrell 2008, 365.)

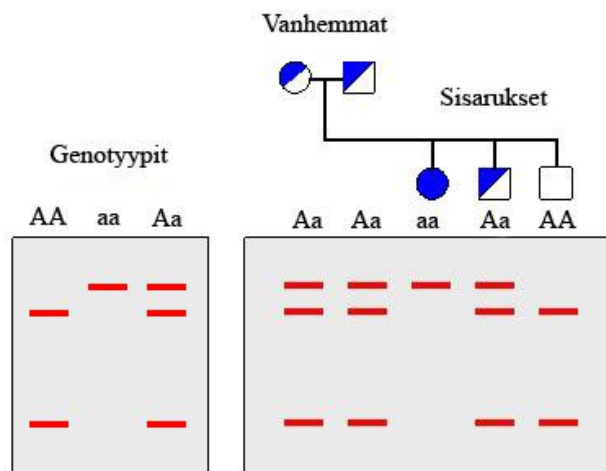
Restriktioendonukleasit pilkkovat vain spesifisen sekvenssin omaavia nukleiinihappoketjuja. Nämä sekvenssit ovat usein niin sanottuja palindromisekvenssejä, mikä tarkoittaa sitä, että kaksoisjuosteen molempien ketjujen sekvenssi on sama ketjujen 5'-päistä

luettuna. Tunnistuskohdan pituus on usein 4–6 emäsparia. Esimerkkinä yleisesti käytetty *E. coli*:sta eristetty *EcoRI*, joka tunnistaa sekvenssit 5'-GAATTC-3' ja vastinjuosteelta 3'-CTTAAG-5'. *EcoRI* tunnistaa sekvenssin ja katkaisee molemmat juosteet guaniniin ja adeniinin välistä, jättäen kaksoisketjuihin kohessiiviset päät. Jotkin restriktioentsyymit jättävät DNA:han tylpät päät, eli ne katkaisevat molemmat nauhat samalta kohdasta. Kohessiivisille päille on kuitenkin molekyylibiologiassa enemmän käyttöä, sillä niiden avulla pilkottu DNA voidaan liittää käyttäen DNA-ligaasientsyymiä takaisin toiseen DNA-nauhaan, esimerkiksi plasmidivektoriin kloonauksen varten. (Campbell & Farrell 2008, 366; Wilson & Walker 2005, 190.) Restriktioentsyymejä on hyvin suuri määrä erilaisia ja monilla niistä on omat tunnistussekvenssinsä. Vaikka useat restriktioentsyymit tunnistavatkin eri sekvenssejä, ne voivat kuitenkin tuottaa samanlaisen päät DNA:han. Näitä entsyymejä kutsutaan isoskitsomeereiksi. (Wilson & Walker 2005, 191.)

DNA:n polymorfiat ovat genettisiä variaatioita, joita esiintyy vähintään yhdellä prosentilla väestöstä, ja niiden pituudet vaihtelevat yhdestä nukleotidista useisiin nukleotideihin. Yhden nukleotidin polymorfioita (englanniksi Single-nucleotide polymorphism eli SNP) esiintyy noin 300:n emäksen välein ja ne ovat yleisin polymorfia tyyppi ihmisen genomissa. Tavallisesti ne esiintyvät genomien ei-koodaavissa osissa, mutta voivat silti altistaa tietyille taudeille. (Kaplan & Pesce 2010, 1039.) Hemokromatoosia yleisimmin aiheuttavat mutaatiot H63D ja C282Y sijaitsevat HFE-geenin eksoneissa, eli koodaavilla alueilla ja ne vaikuttavat suoraan geenituotteeseen HFE-proteiiniin (Barton & Edwards 2000, 9–10; Hannuksela ym. 2008, 1021).

Restriktiofragmenttien pituuspolymorfia-analyysi on tehokas työkalu erityisesti pistemutaatioiden havaitsemisessa. Restriktioentsyymi katkaisee tai on katkaisematta monistetun DNA:n. Esimerkkinä kuvion neljä tilanne, jossa pistemutaatio poistaa restriktioentsyymin tunnistuskohdan, eikä DNA pilkkoudu restriktioentsyymidigestion aikana. Kuvion tilanteessa molemmat vanhemmat ovat tietyn pistemutaation suhteen heterotsygootteja, eli molempien vanhempien toisessa alleelissa on sama pistemutaatio. Tällöin heidän genotyyppinsä Aa tuottaa elektroforeesissa kolme fragmenttia: yhden pilkkoutumattoman fragmentin mutatoituneesta alleelistä ja toisesta taas villityypin DNA:n mukaiset kaksi pienempää fragmenttia. Mikäli mutaatio on molemmissa alleeleissa, eli kyseessä on homotsygootti mutaatio (genotyyppi aa), kummankaan alleelin DNA ei pilkkoudu ja seurauksena on yksi iso fragmentti. Kaksi genotyyppiltään heterotsygoottia

vanhempaa voivat saada jälkeläisen, jonka kummassakaan alleelissa ei ole mutaatiota, eli jälkeläinen on genotyypiltään AA. Restriktiodigestiossa hänen molempien alleeliensa DNA:t pilkkoutuisivat, tuottaen geelille vain kaksi fragmenttia.



KUVIO 4. RFLP:llä todettavat genotyypit ja niiden periytyvyys. (NCBI 2011, muokattu)

Restriktioentsyymejä voi tilata kaupallisesti useilta toimittajilta tarpeen mukaan. Entsyymien mukana toimitetaan usein myös sille sopiva puskuriliuos, jossa suolakonsentraatio, puskuri ja pH on optimoitu katkaisureaktiolle. Entsyymien toimintalämpötilat voivat vaihdella, mutta yleisin käytettävä lämpötila on $+37^{\circ}\text{C}$. Restriktioentsyymidigestio on yksinkertainen suorittaa. Reaktiota varten tunnettu määrä eristettyä tai monistettua DNA:ta siirretään uuteen eppendorf-putkeen, johon lisätään entsyymien puskuria sekä entsyymiä. Putkien sekoituksen jälkeen niitä inkuboidaan entsyymien vaatimassa lämpötilassa tunnin kolmeen tuntiin. Restriktioentsyymien aktiivisuus ilmoitetaan aktiivisuusyksikköinä U, joka tulee englanninkielisestä sanasta unit. U on määritelmänsä mukaan se määrä entsyymiä, joka yhdessä tunnissa pilkkoo 1 mikrogramman DNA:ta. (Suominen ym. 2010, 116.)

3.3 Elektroforeesi

Elektroforeesia käytetään yleisesti nukleiinihappojen ja proteiinien analysoimiseen erilaisten sovellusten yhteydessä. Sovellusten tarkoituksena voi olla erikokoisten molekyylien havaitseminen tai eristäminen näytteestä. (Campbell & Farrell 2008, 130.) Biomolekyylit ovat usein varauksellisia ja ne kulkeutuvat sähkökentässä kohti vastakkaisen

varauksen omaavaa elektrodia (Sheehan 2009, 147). Nukleiinihappojen sisältämät fosfaattiryhmät antavat niille negatiivisen varauksen, joten ne liikkuvat sähkökentässä kohti positiivista napaa eli anodia (Suominen ym. 2010, 123). Nukleiinihappojen elektroforeettinen liikkumisnopeus riippuu useista tekijöistä, joista tärkeimpiä ovat molekyylin nettovaraus, varauksen suhde massaansa, molekyylin muoto, ympäristön lämpötila sekä matriksin, eli ympäröivän aineen huokoisuus ja viskositeetti (Sheehan 2009, 147). Kun matriksin ominaisuudet on tarkkaan määritelty ja analysoitavien molekyylien varaukset voidaan ennakoida (kuten nukleiinihappojen tapauksessa), liikkumiseen vaikuttaa eniten molekyylien koko, jolloin esimerkiksi eripituiset DNA-jaksot erottuvat toisistaan.

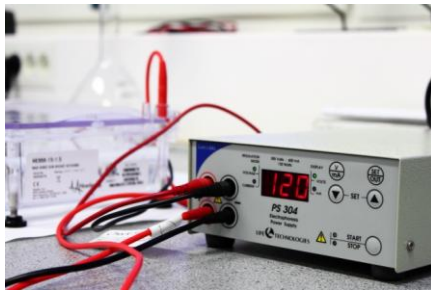
Elektroforeesissa kantoaineena voidaan käyttää lukuisia eri materiaaleja tai liuoksia, kuten puskuroitua vesiliuosta tai kiinteää kantajaa kuten paperi-, selluloosa- tai silikalua. Näillä menetelmillä on yhä käytössä olevia sovelluksia lähinnä kapillaarielektroforeesissa, mutta niiden rajoitukset tekevät niiden käytöstä vähäistä. Vedelliset geelit tarjoavat laajat mahdollisuudet erilaisille sovelluksille elektroforeesissa ja ovat siksi yleisimmin käytetty elektroforeesityyppi. (Sheehan 2009, 148–149.) Pieniä DNA-jaksoja analysoidaan yleisimmin polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (PAGE), jonka erottelukyky on hyvä pienilläkin molekyyliä (Suominen ym. 2010, 122). Lisäksi PAGE:sta on olemassa yksinkertaisia denaturoivia sovelluksia, kuten SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate), jonka ansiosta proteiinien tertiäri- ja kvartaarirakenteiden aiheuttamat liikkuvuuserot saadaan eliminoitua. Tällöin proteiinit erottuvat toisistaan muodosta riippumatta koon ja varauksen perusteella. (Campbell & Farrell 2008, 130.)

Elektroforeesissa käytetty kantaja agarosi on yleisin DNA-näytteiden kohdalla. Agarosi on merilevästä eristettävä polysakkaridi, joka liukenee veteen, kun agarosin vesiliuos kuumennetaan. (Suominen ym. 2010, 122.) Toisin kuin useat muut polysakkaridigeelit, agarosi itsessään on hyvin pitkälti varauksetonta eikä aiheuta sekundaarisia heikkoja vuorovaikutuksia nukleiinihappojen ja proteiinien kanssa (Sheehan 2009, 177). Agarosigeeli valmistetaan lämmittämällä puskuriliuokseen (usein tris-asetatti-EDTA eli TAE tai tris-boraatti-EDTA eli TBE) tehty agarosisuspensio, joka sitten jäähdyytetään, jolloin muodostuu geeliä. Lämmitys avaa agarosin agarobioosi-disakkaridien OH- ja O-ryhmien molekyyllinsisäisiä vetysidoksia ja suspension jäähtyessä osa näistä sidoksista muodostuu molekyylien välille, aikaansaaden geelimäisen, stabiilin olomuodon. Geeliin muodostuu sen agarosikonsentraation perusteella tietyn kokoisia huo-

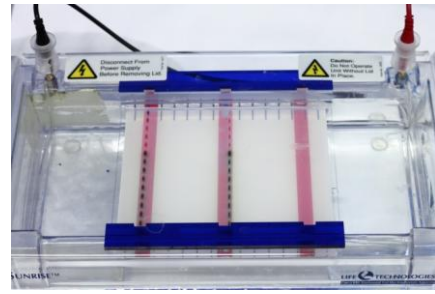
kosia, ja haluttu tiheys valitaan analysoitavien DNA-jaksojen pituuksien perusteella. (Sheehan 2009, 177.)

On kehitetty ominaisuuksiltaan erilaisia agarooseja, jotka soveltuvat eri käyttötarkoituksiin. Eräät geelit on suunniteltu niin, että DNA voidaan erotuksen jälkeen eristää geeliltä (preparatiivinen laatu), toiset ovat tarkoitettu vain DNA:n visualisointiin (analyttinen laatu). Agarosista on olemassa myös muun muassa erityisen matalan sulamispisteen omaavia laatuja (Low Melting Point eli LMP), matalan elektroendosmoosin laatuja (Low Electroendosmosis eli LE), joista kullakin on omat sovelluksensa. (Promega Corporation, 2011a.)

Agarosigeelielektroforeesissa käytetään rakenteeltaan melko yksinkertaista laitetta, joka koostuu ajoaltaasta, altaan pohjalla kummassakin päässä olevista elektrodeista ja turvakannesta (Suominen ym. 2010, 124). Agarosigeeliajo voidaan suorittaa myös pysyasennossa, mutta vaakatasossa oleva niin sanottu sukellusvenegeeliajo on tavallisimmin käytetty menetelmä. Nimitys tulee siitä, että agarosigeeli on upotettu kokonaan ajopuskurin alle. (Wilson & Walker 2005, 473.) Lämmin agarosiliuos kaadetaan geeli-tarjottimelle, jonka avonaiset päät on teipattu tai suljettu altaaseen kuuluvilla padoilla. Mahdolliset ilmakuplat poistetaan geeliltä, näytekampa asetetaan geelille ja geelin annetaan jähmettyä noin 15–30 minuuttia. Kun näytekampa poistetaan, on geeliin muodostunut näytekoloja, joihin näytteet voidaan myöhemmin applikoida, eli ladata. Valmis geeli upotetaan ajopuskurilla täytettyyn altaaseen niin, että geelin pinta peittyy kauttaaltaan. Näyteliuosten tulee olla riittävän tiheitä ja värillisiä, jotta niiden lataus näytekaivojen pohjalle olisi mahdollista. Eräät PCR-reagenssit aikaansaavat näytteille nämä ominaisuudet, mutta toisinaan on käytettävä erillistä latauspuskuria. Geelille applikoidaan aina myös kokostandardia, joka sisältää tunnetun pituisia DNA-jaksoja. Tällöin näytteen tuottamia fragmentteja voidaan verrata kokostandardin tuottamiin fragmentteihin. (Suominen ym. 2010, 124, 127; Wilson & Walker 2005, 474.) Näytteiden latauksen jälkeen ajoallas peitetään turvakannella ja siihen kytketään jännite, joka valitaan anodin ja katodin välimatkan sekä analysoitavien tuotteiden pituuden mukaan (Wilson & Walker 2005, 475).



KUVA 1: Elektroforeesilaitteiston virtalähde (Kuva: Olli Tasso 2011)



KUVA 2: Elektroforeesin ajoallas (Kuva: Olli Tasso 2011)

Geelillä DNA ei näy sellaisenaan, vaan sen visualisoimiseksi vaaditaan värjäys. Yleisin värjäysmenetelmä on etidiumbromidivärjäys, jonka jälkeen DNA-jaksot voidaan havaita geeliltä UV-valon avulla. Nukleiinihappojen emästen väliin tunkeutuvat etidiumionit saavat UV-valosta virittyneiltä emäksiltä energiaa, jolloin ne fluoresoivat oranssinpu-naista valoa. (Suominen ym. 2010, 123.)

Etidiumbromidi voidaan lisätä geeliin jo valun aikana, mikä on yksinkertainen ja nopea tapa värjätä geeli. Toinen vaihtoehto on jälkivärjätä koko geeli vasta elektroforeesiajon jälkeen. Jälkivärjäyksellä havaittavat DNA-fragmentit ovat terävämmät, mutta värjäys vie aikaa ja tuottaa paljon karsinogeenistä etidiumbromidijätettä. (Suominen & Ollikka 2003, 72.) Esivärjäyksen etuna nopeuden lisäksi on se, että geeliä voidaan käydä tarkas-telemassa ajon aikana UV-valossa, jos halutaan varmistua fragmenttien riittävästä ero-tuksesta.

4 TYÖOHJEEN TUOTTAMINEN TOIMINTATUTKIMUKSENA

4.1 Toiminnallinen tutkimus

Toiminnallinen opinnäytetyö tavoittelee ammatillisessa kentässä käytännön toiminnan ohjeistamista, opastamista, toiminnan järjestämistä tai järjeistämistä, tai jo olemassa olevien käytäntöjen parantamista järkeillen. Toiminnallisen opinnäytetyön tuotoksena syntyy aina alasta riippuva konkreettinen tuote, esimerkiksi ammatilliseen käytäntöön suunnattu ohje, ohjeistus tai opastus, kuten perehdyttämisopas, ympäristöohjelma tai turvallisuusohjeistus. Tuotoksen sisältö on suunniteltava niin, että se palvelee kohde-ryhmää käytettävyydeltään, asiasisällöltään, informatiivisuudeltaan ja houkuttelevuudeltaan. (Heikkinen 2006, 16; Vilka & Airaksinen 2003, 9, 51–53.) Oma tuotoksemme on bioanalyttikko-opiskelijoille suunnattu työohje, joten kaikkien termien selvittäminen tuotoksessa ei ole tarpeellista, vaan tärkeämpää on informatiivisuus ja selkeä ulkoasu.

Toiminnallisen tutkimuksen suunnittelussa on tärkeää tutustua tutkittavaan ilmiöön hyvin kirjallisuuden pohjalta, ja selvittää aikaisempien vastaavien tutkimusten esille nostamia kysymyksiä. Teoreettinen viitekehys antaa pohjan tutkimukselle, jossa kerätään uutta tietoa. Terhi Huovisen ja Esa Rovion mukaan toimintatutkimuksen tiedonkeruumenetelmistä tärkeimpiä ovat osallistuva havainnointi ja havainnoinnin pohjalta kirjoitettu tutkimuspäiväkirja. Tutkimuspäiväkirjaan tutkija kerää järjestelmällisesti aineistoa tutkimuksensa eri vaiheista, kiinnittäen huomiota ennalta määrättyjen tutkimusongelmien kannalta tärkeisiin seikkoihin. Kattava ja jatkuvasti päivitetty päiväkirja auttaa tutkijaa muistamaan tehdyt työt ja niiden aikana esille nousseet havainnot. (Huovinen & Rovio 2006, 104, 107.)

Toimintatutkimuksen alkaessa tutkimuksen tekijällä on oltava ennakkoaistus tutkimuksen kulusta, mutta siihen ei tule takertua liikaa. Terhi Huovinen ja Esa Rovio (2006, 96) tarkentavat, että tutkimusprosessiin kuuluu aina arvaamattomuus, ja että tutkimus voi nostaa esiin uusia kysymyksiä. Näiden kysymysten seuraaminen voi tuoda tutkimukseen uusia ulottuvuuksia, mikäli tutkimukseen on käytettävissä riittävästi aikaa. Uusien ongelmien muodostumisen voikin ajatella olevan yksi merkki syventymisestä aiheeseen. Uudet kysymykset voi esittää tutkimuksen tuloksia pohdittaessa, jolloin joku muu voi tarttua niihin ja jatkaa alulle laitettua prosessia omana tutkimuksenaan.

Toiminnallisen opinnäytetyön raportissa tulee selvittää mitä, miksi ja miten on tehty, sekä millaisia tuloksia on saatu ja millaisia johtopäätöksiä niiden pohjalta on tehty. Toiminnallisessa opinnäytetyössä on tärkeä kertoa lukijoille konkreettisesti tiedonhankintamenetelmistä ja käytännön toteutuksesta. (Vilkka & Airaksinen 2003, 55, 65.) Omaa raporttiamme varten tulemme kirjoittamaan päiväkirjaa, jossa pidämme kirjaa kokeen eri vaiheiden toteutuksesta, sekä prosessin aikana saaduista tuloksista. Vilkka ja Airaksinen (2003, 82) kuvailevat opinnäytetyöraporttia tekstilajina kertomukseksi, jossa on projektia ja työprosessia kuvaileva juoni. Oman tutkimuksen aikana kirjoittamamme tutkimuspäiväkirja toimii pohjana raporttiosalle ja vasta sen pohjalta syntyy lopullinen tuotos. Toiminnallisen opinnäytetyömme toteutustapana eli materiaalinhankintamenetelmänä käytämme kokeellisen tutkimuksen metodeja.

4.2 Kokeellinen tutkimus

Kokeellisessa tutkimuksessa mitataan yhden käsiteltävän muuttujan vaikutusta toiseen muuttujaan. Tyypillisesti kokeellisessa tutkimuksessa valitaan näyte, jota analysoidaan erilaisilla koejärjestelyillä harkitusti ja systemaattisesti olosuhteita muunnellen. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 134.)

Yhteen suunnitelmaan perustuvaa kokeilua seuraa kokemusten pohjalta parannettu suunnitelma. Toiminta hiotaan useiden peräkkäisten suunnittelu- ja kokeilusykliden avulla. Näin muodostuu kokeilujen ja tutkimuksen vuorovaikutuksena etenevä spiraali. Useat peräkkäiset syklit siis muodostavat kokeellisen tutkimuksen spiraalin, jossa ajattelu ja toiminta liittyvät toisiinsa peräkkäisinä suunnittelun, toiminnan, havainnoinnin, reflektion ja uudelleensuunnittelun kehinä. (Heikkinen 2006, 19.)

Kokeellinen tutkimus etenee suunnittelun, toiminnan ja arvioinnin yhteisvaikutuksesta. Jos edellä mainittua sykliä suorittaa ainoastaan yhden kerran, on todettu että tällöin siitä ei voida puhua kokeellisena tutkimuksena. (Heikkinen, Rovio & Kiilakoski 2006, 81–82.) Esimerkiksi opinnäytetyössämme teemme ensimmäiseksi työohjeen testauksen, jonka jälkeen pohdinnan ja vaadittavien tarkistusten kautta saamme kokeellisen osuuden suoritettua sekä hyvän uuden työohjeen laadittua sopivaksi opetuskäyttöön. Tämän johdosta opinnäytetyötämme voi määritelmien mukaan kutsua toiminnalliseksi kokeelliseksi opinnäytetyöksi.

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT

Opinnäytetyömme tarkoituksena on testata HFE-geenin perinnöllistä hemokromatoosia aiheuttavien H63D- ja C282Y-mutaatioiden osoitukseen käytettävä Promega Corporationin laatima menetelmä (Promega Corporation 2008, 1). Testauksen jälkeen suoritamme menetelmäoptimoinnin sekä laadimme suomenkielisen työohjeen Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan ja laboratorioalan koulutusohjelmien käyttöön. Työohjetta voidaan käyttää molekyylibiologian harjoitustöissä kehittämään opiskelijoiden molekyylibiologian perusmenetelmien hallintaa. Työohjeessa käytettävät menetelmät (PCR, RFLP ja AGE) ovat tarkkuutta ja huolellisuutta vaativia. Tarkoituksenamme on laatia selkeä, opiskelijoiden omaa ajattelua ja tulkintakykyä kehittävä työohje. Nykyisellään olemassa oleva työohje ei sovellu harjoitustöiden tekemiseen, sillä saatujen epäselvien tulosten vuoksi.

Opinnäytetyön tavoitteena on kehittää työohjetta paremmin opiskelijakäyttöön soveltuvaksi, sekä tuoda menetelmäoptimoinnin kautta säästöjä reagenssikuluihin. Menetelmän optimoinnin yhteydessä käyttöön voidaan ottaa toisen valmistajan edullisempia reagensseja. Lisäksi tavoitteenamme on yhtenäistää Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman harjoitustyöohjeita. Laadimme työohjeen vastaamaan sisällöltään laatustandardeja SFS-EN ISO 17025 ja SFS-EN ISO 15189. Ulkoasun mallina käytämme Laboratoriokeskuksen työohjetta.

Opinnäytetyön tehtävänä on kokeellisesti selvittää mikä nykyisessä työohjeessa aiheuttaa Promega Corporationin HFE-geenin mutaatioiden havaitsemismenetelmän heikon toimivuuden, sekä minkälaisilla keinoilla sen toimivuutta voidaan parantaa. Lisäksi sen tehtävänä on tuottaa menetelmäoptimoinnin kautta muokattu harjoitustöihin soveltuva laadukas työohje.

6 TYÖOHJEEN KOEKÄYTTÖ

Alkuperäisen työohjeen koekäyttö suoritettiin vuoden 2011 keväällä. Ensimmäisenä päivänä suoritettiin HFE-geenin eksonien 2 ja 4 monistus PCR-syklityksellä, toisena päivänä monistustuotteet pilkottiin restriktioendonukleasidigestiolla ja kolmantena päivänä digestiotuotteet analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla.

TAULUKKO 1: Koekäytössä käytetyt välineet

Sunrise™ Geelielektroforeesilaitte (GIBCO BRL)
HE 99X Geelielektroforeesilaitte (Hofer)
PS 304 Elektroforeesivoimanlähde (GIBCO BRL)
UV-valopöytä ja kamera
MiniCycler™ PCR-laite lämpökannella (MJ RESEARCH)
VortexGenie 2 Koeputkisekoittaja (Scientific Industries)
Galaxy Mini-sentrifugi (VWR)
3005 Tasosekoittaja (GFL)
Esisteriloituja suodatinkärkiä, 10 µl ja 100 µl
Steriloituja Eppendorf-putkia, 0,5 ml ja 1,5 ml

TAULUKKO 2: Koekäytössä käytetyt reagenssit ja näytteet

Eksonin 2 alukkeita 1 ja 2 (Sigma)
Eksonin 4 alukkeita 1 ja 2 (Sigma)
GoTaq® Hot Start DNA Polymeraasi (Promega)
<i>Mbo</i> I restriktioendonukleasi (Promega)
<i>Rsa</i> I restriktioendonukleasi (Promega)
BenchTop PCR Markers 1000–50bp -kokostandardi (Promega)
5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega)
MgCl ₂ 25mM (Promega)
dNTP 10 mM (FINNZYMES)
C187G-homotsygootti genominen DNA (Coriell NA14620)
C187G/villityyppi heterotsygootti genominen DNA (Coriell NA14690)
187 ja 845 nukleotidien suhteen villityyppi genominen DNA (Coriell NA14656)
G845A homotsygootti genominen DNA (Coriell NA14686)
C187G ja G845A yhdistelmä heterotsygootti genominen DNA (Coriell NA14650)
Agaroosi LMP (Promega)
Agaroosi LE (Roche)
1X TAE-puskuri
Nukleasivapaa vesi (Promega)

6.1 Suoritus

Ensimmäisenä päivänä nostimme tarvittavat reagenssit ja DNA-näytteet pakastimesta jäähauteelle, joista kukin sulatettiin erikseen tarvittaessa. Sulatuksen jälkeen sekoitimme putket koeputkisekoittajalla ja neste kerättiin putkien pohjalle mikrosentrifuugilla. Polymeraasientsyymiä ei kuitenkaan erikseen sulatettu eikä sekoitettu, vaan se säilytettiin koko ajan jäähauteella. Alkuperäisestä työohjeesta poiketen käyttämämme alukkeet toimitettiin erillisinä, eikä valmiina seoksena. Lopulliseen seokseen pipetoimme siis 5 mikrolitraa kutakin aluketta, jolloin yhden reaktioseoksen kokonaisalukemääräksi saatiin 50 pmol. Alkuperäisessä työohjeessa (Promega Corporation 2008, 3–4) on magnesiumkloridin ja DNA-polymeraasin määrien suhteen ristiriita. Työohjeessa on erillinen kohta, jossa kehoitetaan varmistamaan että kussakin reaktioseoksessa: konsentroidu pus-kuri (5X) laimenee viidesosaan, magnesiumkloridikonsentraatio (MgCl_2) on 1,5mM ja polymeraasin määrä on 0,5 yksikköä (U eli unit). Mastermix 1-liuoksen pipetointitaulukon tilavuuksilla edellä mainitut ehdot toteutuvat, mutta mastermix 2-tilaukossa olevat tilavuudet olisivat tuottaneet virheelliset konsentraatiot. Tästä syystä käytimme mastermix 1:n tilavuuksia myös mastermix 2:n teossa. Ensimmäiseksi valmistimme mastermix:it 1 ja 2 taulukoiden 3 ja 4 mukaisesti 1,5ml:n eppendorf-putkiin.

TAULUKKO 3: Mastermix 1

Ainesosat	Varastoliuoksen konsentraatio	Tilavuus kymmenelle reaktiolle	Konsentraatio /PCR -reaktioseos
Eksonin 2 aluke 1	50 μM	5 μl	0,5 pmol/ μl
Eksonin 2 aluke 2	50 μM	5 μl	0,5 pmol/ μl
5X Green GoTaq® Flexi Buffer	5X	100 μl	1X
MgCl_2	25mM	50 μl	2,5 mM
dNTP	10 mM	10 μl	200 μM
GoTaq® Hot Start DNA Polymeraasi	5U/ μl	2,5 μl	1,25U
Nukleaasivapaa vesi	-	75,5 μl	-
Lopputilavuus	-	250 μl	-

TAULUKKO 4: Mastermix 2

Ainesosat	Varastoliuoksen konsentraatio	Tilavuus kymmenelle reaktiolle	Konsentraatio /PCR -reaktioseos
Eksonin 4 aluke 1	50µM	5 µl	0,5 pmol/µl
Eksonin 4 aluke 2	50µM	5 µl	0,5 pmol/µl
5X Green GoTaq® Flexi Buffer	5X	100 µl	1X
MgCl ₂	25mM	50 µl	2,5 mM
dNTP	10 mM	10 µl	200 µM
GoTaq® Hot Start DNA Polymeraasi	5U/µl	2,5 µl	1,25U
Nukleaasivapaa vesi	-	75,5 µl	-
Lopputilavuus	-	250 µl	-

Tämän jälkeen lisäsimme kahdeksaan merkitsemäämme 0,5 ml:n eppendorf-putkeen reagenssit taulukon 5 mukaisessa järjestyksessä.

TAULUKKO 5: PCR-seosten ainesosat ja tilavuudet

Reaktionumero	Nukleaasi-vapaa vesi	DNA-näyte	PCR Master-mix 1	PCR Master-mix 2
1 (negatiivinen kontrolli)	25,0 µl	-	25,0 µl	-
2 (negatiivinen kontrolli)	25,0 µl	-	-	25,0 µl
3 (eksoni 2)	24,0 µl	1,0 µl (NA14656)	25,0 µl	-
4 (eksoni 2)	24,0 µl	1,0 µl (NA14690)	25,0 µl	-
5 (eksoni 2)	24,0 µl	1,0 µl (NA14620)	25,0 µl	-
6 (eksoni 4)	24,0 µl	1,0 µl (NA14656)	-	25,0 µl
7 (eksoni 4)	24,0 µl	1,0 µl (NA14650)	-	25,0 µl
8 (eksoni 4)	24,0 µl	1,0 µl (NA14686)	-	25,0 µl

Pipetointien jälkeen sekoitimme eppendorf-putket, keräsimme nesteen putkien pohjalle ja siirsimme putket PCR-laitteeseen, johon olimme jo etukäteen ohjelmoineet Promega Corporationin ohjeen (2008, 5) mukaisen ohjelman. Syklityksen jälkeen siirsimme reaktiopotket pakastimeen noin -18°C:een.

TAULUKKO 6: PCR -ohjelma

Toiminta		Lämpötila	Aika
Alkudenaturaatio		95°C	2 min
35 sykliä	Denaturaatio	94°C	30 sek
	Annealing	60°C	30 sek
	Ekstensio	72°C	30 sek
Loppuekstensio		68°C	7 min
Lopetus		4°C	

Toisena päivänä teimme ensimmäisenä päivänä saaduille PCR-tuotteille digestio *Mbo*I- ja *Rsa*I-restriktioentsyymeillä. Digestion suoritimme inkuboimalla reaktioseokset 37 °C lämpötilassa PCR-laitteella kolmen tunnin ajan. PCR-tuotteet, 10x puskuri C ja restriktioentsyymit sulatimme ennen töiden aloittamista. Sekoitimme sulatetut aineet putkisekoittajalla ja keräsimme ne putkien pohjalle mikrosentrifugilla. Ennen pipetointia merkitsimme kymmenen 0,5 millilitran eppendorf-putkea juoksevilla numerolla digestiota varten. Pipetoimme eppendorf-putkiin PCR-tuotteet sekä muut tarvittavat aineet alkuperäisen ohjeen mukaan seuraavasti.

TAULUKKO 7: Digestioseosten pipetointitilavuudet

Digestio reaktion numero	PCR-tuotteen numero	PCR-tuotteen tilavuus	10x puskuri C tilavuus	<i>Mbo</i> I tilavuus	<i>Rsa</i> I tilavuus
1D	#1	26µl	3µl	1µl	
2D	#2	26µl	3µl	-	1µl
3D	#3	8µl	-	-	-
4D	#3	26µl	3µl	1µl	-
5D	#4	26µl	3µl	1µl	-
6D	#5	26µl	3µl	1µl	-
7D	#6	8µl	-	-	-
8D	#6	26µl	3µl	-	1µl
9D	#7	26µl	3µl	-	1µl
10D	#8	26µl	3µl	-	1µl

Hemokromatoosigeenin (HFE-geeni) eksonista 2 PCR:llä monistettu tuote on pituudeltaan 208 emäsparia. Tässä tuotteessa villityypillä on yksi katkaisukohta *MboI*-restriktioentsyymillä, joten digestion tulisi tuottaa kaksi fragmenttia. C187G-mutaatio tässä alleelissa hävittää restriktioentsyymien tunnistuskohdan, joten fragmentin tulisi jäädä 208 emäsparin pituiseksi. Eksonin 4 PCR:llä monistettu tuote on pituudeltaan 390 emäsparia. Villityypillä tässä tuotteessa on yksi katkaisukohta *RsaI*-restriktioentsyymillä, joten digestion tulisi tuottaa kaksi fragmenttia. G845A-mutaation johdosta tähän alleeliin tulee lisää yksi tunnistuskohta *MboI*-restriktioentsyymille ja täten digestiossa tulisi syntyä kolme fragmenttia. Pienin fragmentti ei välttämättä ole nähtävissä geeliltä.

Kolmantena päivänä teimme agarosigeelielektroforeesiajon ja restriktiofragmenttien pituuspolymorfia-analyysin. Teimme kaksi 3% vahvuista agarosigeeliä, joihin tuli 2,5% LMP-agarosia ja 0,5% LE-agarosia. Teimme kaksi geeliä, koska halusimme vertailla tuloksia jälkivärjäyksellä tehdyn ajon ja esivärjäyksellä tehdyn ajon välillä. LMP ja LE punnittiin erlenmeyerkolveihin ja liuotettiin vaadittavaan tilavuuteen 1x TAE-puskuria. Geelien annoimme jähmettyä 45 minuuttia ennen kuin aloimme ladata digestoituja DNA-näytteitä. Yhtä näytesarjaa varten tarvitaan 12 kaivoa, joihin pystyy lataamaan 12 µl näytettä. Käytimme GoTaq® Green Flexi -puskuria molempiin mastermix-liuoksiin, joten latausväriä ei tarvinnut lisätä erikseen reaktioseoksiin. Alkupe-
räisen ohjeen mukaan teimme jälkivärjäyksen 5,0µg/ml etidiumbromidiliuoksessa agarosigeelielektroforeesiajon jälkeen. Toinen geeli, joka oli tilavuudeltaan 100ml, esivärjättiin 10mg/ml etidiumbromidiliuoksella lisäämällä sitä 5µl geeliin ennen sen jähmettymistä. Kun geelit olivat jähmettyneet, siirsimme ne kelkkojen kanssa ajoaltaisiin ja täytimme altaat 1x TAE-puskurilla niin, että geeli jäi kokonaan puskurin pinnan alle.

Esivärjättyyn agarosigeeliin latasimme digestoidut näytteet sekä BenchTop-kokostandardia näytesarjan päihin ensimmäiseen kaivorivistöön ja PCR-tuotteet toiseen kaivorivistöön. PCR-tuotteet latasimme geelille, koska halusimme nähdä onko PCR toiminut oikein. Jälkivärjättävään geeliin latasimme digestoidut näytteet ja näytesarjan päihin BenchTop -kokostandardia. Elektroforeesiajo aloitettiin 120 voltin jännitteellä ja ajon aikana nostettiin jännitettä hiljalleen 128 volttiin. Jännitettä nostettiin, koska koimme ajonopeuden hitaaksi ja ajoaltaat eivät kuumenneet lainkaan. Elektroforeesiajo kesti kaikkiaan noin yhden tunnin.

Agaroosigeelielektroforeesin jälkeen teimme toiselle geeleistä alkuperäisen ohjeen mukaisen jälkivärjäyksen 5,0µg/ml etidiumbromidiliuoksessa. Geeliä värjättiin liuoksessa 10 minuuttia ja värin poisto tehtiin luokan kaksi laboratoripuhtaassa vedessä. Värjäys sekä värin poisto tehtiin myrkyllisille aineille tarkoitettussa astiassa ja tasosekoittajassa. Etidiumbromidi on karsinogeeninen aine, joten liuoksia ei saa kaataa viemäriin, vaan ne täytyy hävittää asianmukaisesti. Agaroosigeelit kuvasimme UV-valossa polaroidfilmille.

6.2 Tulokset

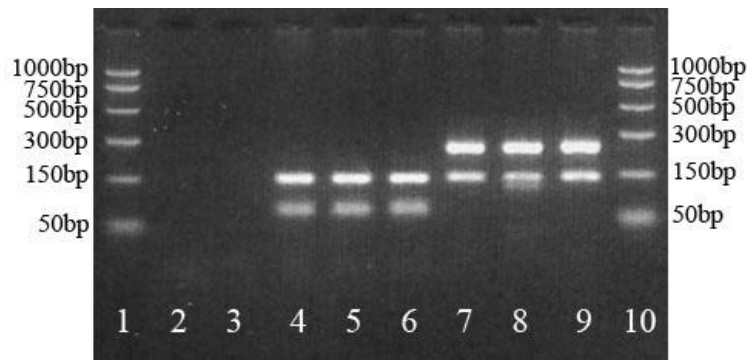
Kuvassa 3 sivulla 32 kaivoissa yksi ja kaksitoista näkyvät BenchTop-kokostandardit, jonka fragmentit ovat kooltaan 1000, 750, 500, 300, 150 ja 50 emäsparia. Kaivoihin kaksi ja kolme ei pidä tulla fragmenttia, koska näihin latasimme negatiivista kontrollia. Kaivossa kaksi on HFE-geenin eksonin 2 negatiivinen kontrolli ja kaivossa kolme eksonin 4 negatiivinen kontrolli. Kontrollit eivät sisältäneet näyte DNA:ta. Kaivoon neljä latasimme leikkaamattoman eksonin 2 villityyppi C187-näytettä, joka näkyy kuvassa yhtenä fragmenttina ja on 208 emäsparin pituinen. Kaivossa viisi näkyy kaksi fragmenttia, 138 ja 70 emäsparin pituisina. Tähän kaivoon latasimme villityypin homotsygootti C187/C187-näytteen, jonka restriktioentsyymi *MboI* pilkkoi yhdestä kohdasta. Kaivossa kuusi on heterotsygootti C187/C187G-mutaatio, toisessa alleelissa on sytosiini muuttunut guaniiniksi. *MboI*-restriktioentsyymi katkaisee C187-alleelin kahteen osaan, 138 ja 70 emäsparin pituisiksi. Mutatoituneessa alleelissa C187G tunnistuskohta on hävinnyt, joten fragmentti jää 208 emäsparin pituiseksi. Tämän mutaation tulee siis näkyä geelillä kolmena fragmenttina. Testauksessamme emme saaneet 208 emäsparin mittaista fragmenttia näkyviin. Kaivoon seitsemän latasimme homotsygootti C187G/C187G-mutaationäytteen, jossa HFE-geenin eksonin 2 molemmissa alleeleissa sytosiini on muuttunut guaniiniksi. Tämä mutaatio hävittää *MboI*:n tunnistuskohdan, joten restriktiota ei pitäisi tapahtua. Ensimmäisessä kokeilussamme kuitenkin tapahtui restriktiota, joka näkyy kuvassa kahtena fragmenttina.

Kuvassa 3 sivulla 32 kaivossa kahdeksan on leikkaamaton eksonin 4 villityyppi G845-näyte, joka näkyy yhtenä 390 emäsparin fragmenttina geelillä. Kaivossa yhdeksän on villityyppi G845- näyte, jossa on yksi tunnistuskohta restriktioentsyymille *RsaI*, joten se näkyy geelillä 248 ja 142 emäsparin pituisina fragmentteina. Kaivossa kymmenen on

yhdistelmä heterotsygootti C187G/G845A-mutaationäyte, jossa kummassakin eksonissa on tapahtunut toisen alleelin suhteen mutaatio, toisessa sytosiini on muuttunut guaniksi ja toisessa guaniini on muuttunut adeniiniksi. Tämä mutaatio näkyy geelillä 248, 142 ja 113 emäsparin pituisina fragmentteina. G845A-mutaatio tuottaa HFE-geenin eksoniin 4 yhden uuden katkaisukohdan. Kaivossa 11 on homotsygootti G845A/G845A-mutaationäyte. G845A-mutaatio tuottaa HFE-geenin eksoniin 4 yhden uuden katkaisukohdan. Fragmenttien pituudet ovat 248, 113 ja 29 emäsparia, mutta 29 emäsparin pituinen fragmentti ei välttämättä näy geelillä. Kokeessamme geelillä näkyvät fragmentit eivät ole odotetun mukaiset, vaan 113 emäsparin pituisen jakson sijasta nähdään fragmentti noin 142 emäsparin kohdalla. Kuvassa neljä (sivu 33) ei ole käytetty pilkkomattomia monistustuotteita, koska pilkkomattomia digestioseoksia ei riittänyt esivärjätyle geelille.



KUVA 3: Jälkivärjätty AGE. Kaivot 1 ja 12 BenchTop-kokostandardit, kaivo 2 eksonin 2 negatiivinen kontrolli, kaivo 3 eksonin 4 negatiivinen kontrolli, kaivo 4 digestoimaton eksonin 2 wt C187, kaivo 5 wt C187/C187, kaivo 6 C187/C187G, kaivo 7 C187G/C187G, kaivo 8 digestoimaton eksonin 4 wt G845, kaivo 9 wt G845, kaivo 10 C187G/G845A, kaivo 11 G845A/G845A

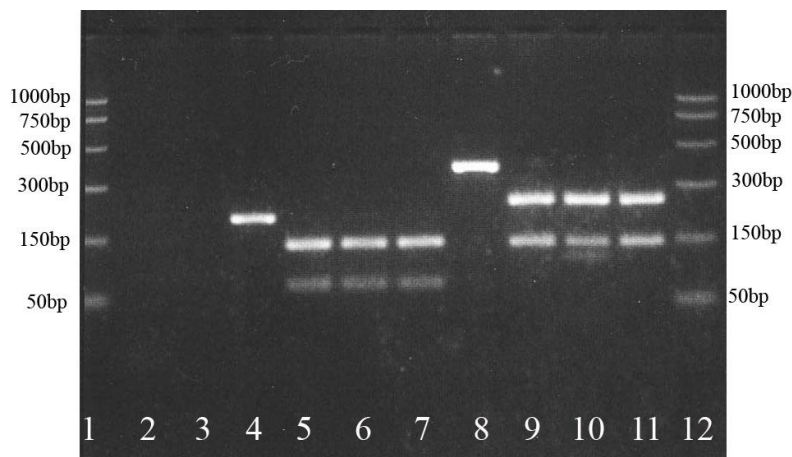


KUVA 4: Esivärjätty AGE. Kaivot 1 ja 10 BenchTop-kokostandardit, kaivo 2 eksonin 2 negatiivinen kontrolli, kaivo 3 eksonin 4 negatiivinen kontrolli, kaivo 4 wt C187/C187, kaivo 5 C187/C187G, kaivo 6 C187G/C187G, kaivo 7 wt G845, kaivo 8 C187G/G845A, kaivo 9 G845A/G845A

Kuvista 3 (sivu 32) ja 4 näemme jälkivärjätyn ja esivärjätyn geelien sopivan tähän työhön yhtä hyvin, joten työtä helpottaaksemme, jätämme jälkivärjäyksen kokonaan pois. Tämä sen vuoksi, että etidumbromidijätettä muodostuu jälkivärjäyksen yhteydessä runsaasti ja lisäksi geeliä on vaikea siirrellä värjäysastiaan ja pois sieltä. Opiskelijoiden harjoitustöiden helpottamiseksi nämä esteet on syytä ohittaa käyttämällä etidumbromidin lisäystä geeliin ennen sen valua.

7 MENETELMÄN OPTIMOINTI

Koska tulokset eivät olleet ensimmäisen kokeilun jälkeen toivotun mukaiset, toistimme kokeen ensimmäisen testauksen mukaan. Tämän lisäksi testasimme samalla geeliä joka oli valmistettu pelkästään edullisemmasta Rochen LE-agarosista. Geelistä tehtiin 3%:n vahvuinen ja sillä saadut tulokset vastasivat hyvin ensimmäisen kokeen tuloksia. Toinen koe osoitti, että ensimmäisellä kerralla saadut epäjohtonmukaiset tulokset eivät todennäköisesti johtuneet tekijöiden virheistä.



KUVA 5: 3% Roche LE-agarooosi, samat näytteet kuin kuvassa 3 sivulla 33

7.1 Restriktioentsyymien vaihto

Genominen DNA on usein voimakkaasti metyloitunutta ja tämä voi olla yksi syy restriktion epäjohtonmukaisiin tuloksiin. Restriktioentsyymien metylaatio-sensitiivisyys vaihtelee entsyymeittäin ja käytettyjen *MboI*- ja *RsaI*-entsyymien tilalle vaihdettiin niiden isoskitsomeerit *BclI* ja *CviQI*, jotka ovat vähemmän sensitiivisiä. Uudet entsyymit tunnistavat ja katkaisevat DNA:sta saman sekvenssin, mutta vaativat erilaiset digestio-olosuhteet toimiakseen optimaalisesti. *BclI*:n tehokkain inkubaatiolämpötila on 50°C, ja *CviQI*:n 25°C (New England Biolabs 2007, 27, 43). *CviQI* vaatii myös BSA:n (Bovine serum albumin) lisäämistä reaktioseokseen, sillä BSA tasapainottaa entsyymin toimintaa, vähentää entsyymin ja putken seinämien välisiä interaktioita sekä sitoo entsyymi-inhibiittoreita (Williams, Kline & Smith 1996, 46). Entsyymit tilattiin New England Biolabs:lta ja entsyymien mukana toimitettiin niiden kanssa käytettävät puskurireagenssit ja *CviQI*:n tarvitsema BSA.

Hemokromatoosigeenin eksonien 2 ja 4 monistuksen suoritimme polymeerasiketjureaktiolla kuten aiemminkin, mutta restriktiota muokkasimme vastaamaan uusien entsyymien tuottajan suosituksia. Pipetoimme reagenssit digestioputkiin taulukon 8 mukaisessa järjestyksessä. 10x NEBuffer 3-digestiopuskuria, jonka ainesosien keskinäiset suhteet sopivat parhaiten *BclI*- ja *CviQI*-entsyymeille, tuli kuhunkin digestioseokseen 1/10 lopputilavuudesta. *CviQI*-entsyymien vaatimaa 100x BSA:ta lisäsimme 2D-, 8D-, 9D- ja 10D -putkiin, mutta sen pieni määrä ei muuta ratkaisevasti reagenssien suhteita. *CviQI*:n aktiivisuus on sama kuin aiemmin käytetyn *RsaI*:n aktiivisuus (10 000U/ml), joten sen määrää ei ollut tarvetta muuttaa (Promega Corporation 2011c; New England Biolabs 2007, 43). *BclI*:n aktiivisuus (15 000U/ml) on suurempi kuin *MboI*:n aktiivisuus (10 000U/ml), mutta emme kokeneet tarpeelliseksi vähentää restriktioentsyymien jo entuudestaan pientä tilavuutta. Digestioseokset inkuboitiin eri laitteilla entsyymien lämpötilavaatimusten vuoksi. Inkubaatioajaksi New England Biolabs (2007, 27, 43) suosittelee 1–4 tuntia, joten säilytimme ajan alkuperäisessä kolmessa tunnissa.

TAULUKKO 8: Digestioseosten pipetointi

Digestio reaktion numero	PCR-tuotteen numero	PCR-tuotteen tilavuus	10x NE-Buffer 3 tilavuus	<i>BclI</i> tilavuus	<i>CviQI</i> tilavuus	BSA tilavuus
1D	#1	26µl	3µl	1µl	-	-
2D	#2	26µl	3µl	-	1µl	0,3µl
3D	#3	8µl	-	-	-	-
4D	#3	26µl	3µl	1µl	-	-
5D	#4	26µl	3µl	1µl	-	-
6D	#5	26µl	3µl	1µl	-	-
7D	#6	8µl	-	-	-	-
8D	#6	26µl	3µl	-	1µl	0,3µl
9D	#7	26µl	3µl	-	1µl	0,3µl
10D	#8	26µl	3µl	-	1µl	0,3µl

Agaroosigeelielektroforeesiajoa varten teimme kaksi geeliä, 3% LE-geelin kuten aiemminkin ja lisäksi testasimme 2,5% LE-geelin soveltuvuutta näiden restriktiofragmenttien pituuspolymorfia-analyysiin. Havaitsimme että 2,5% LE-agaroosigeeli soveltuu yhtä

hyvin kuin 3% LE-agarosi tähän analyysiin, mutta restriktioendonukleaasien vaihdosta huolimatta tulokset pysyivät samoina.

7.2 Mutaatiot näytteissä

Tulosten ollessa väärät restriktioentsyymien vaihdosta huolimatta, päädyimme pohtimaan muita vaihtoehtoja tulosten korjaamiseksi. Koska restriktioreaktiot toimivat samalla tavalla sekä alkuperäisillä että uusilla entsyymeillä, voidaan ajatella, että itse digestiossa ei kuitenkaan olisi suurta ongelmaa. Polymeraasiketjureaktiossa monistuivat oikean pituiset jaksot, mutta DNA-näytteissä ei vaikuttanut olevan restriktioentsyymien tunnistuskohtia alkuperäisen työohjeen mukaisissa paikoissa. Kuvan 3 (sivu 32) kaivoissa neljä, viisi, kahdeksan ja yhdeksän käytetty DNA (NA14656) käyttäytyi kuten villityypin DNA ja reaktiot toimivat oikein. Kaivossa kymmenen käytetty DNA (NA14650) toimi myös oikein ja tuotti G845A-heterotsygoottimutaation mukaiset kolme fragmenttia restriktioentsyymillä *RsaI*. Sen sijaan kaivossa kuusi oleva DNA (NA14690) käyttäytyi kuten villityypin DNA, vaikka sen pitäisi alkuperäisen työohjeen mukaan olla C187G-mutaation suhteen heterotsygootti mutantti. Kaivossa seitsemän oleva näyte (NA14620) käyttäytyi myös kuten villityypin DNA, vaikka alkuperäinen työohje ilmoittaa sen olevan C187A-homotsygootti mutantti. Myös kaivossa yksitoista oleva näyte (NA14686) käyttäytyi kuten villityypin DNA, vaikka ohjeen mukaan sen tulisi olla G845A-mutaation suhteen homotsygootti mutantti. Ajattelimme, että vian täytyy löytyä DNA-näytteistä, joten suunnittelimme tarkistavamme jokaisesta DNA:sta molempien eksonien mutaatiot sekä *MboI*- että *RsaI*-entsyymeillä. Ennen uuden kokeen aloittamista päätimme kuitenkin tarkistaa DNA-näytteiden toimittajan (Coriell Institute for Medical Research) internetsivuilta niiden mutaatiot, jolloin selvisi että näytteiden todelliset mutaatiot ovat taulukon 9 mukaisia.

Tampereen ammattikorkeakoululle hankitut DNA:t tilattiin Coriell Institute for Medical Research:lta Promega Corporationin työohjeen mukaisilla näytenumeroilla, eivätkä ne työohjeen virheistä johtuen sisältäneet haluttuja mutaatioita. Käytössä olevista DNA-näytteistä testasimme eri mutaatiotyypit niiltä osin kuin näillä näytteillä oli mahdollista, todetaksemme sen, että mutaatioiden osoitusmenetelmä toimii.

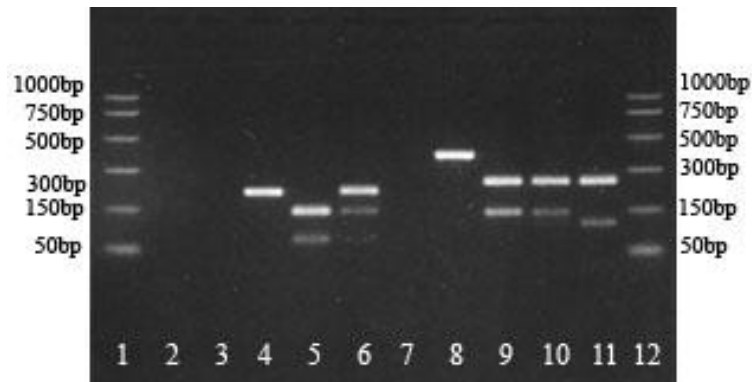
TAULUKKO 9: Mutaatiot DNA –näytteissä (Coriell Institute for Medical Research 2009; Promega Corporation 2008, 9.)

Näytenumero	Alkuperäisen työohjeen mukainen mutaatio	Todellinen mutaatio
NA14620	C187G homotsygootti	G845A homotsygootti
NA14650	C187G/G845A yhdistelmäheterotsygootti	C187G/G845A yhdistelmäheterotsygootti
NA14656	Villityyppi nukleotidien 187 ja 845 suhteen	Villityyppi nukleotidien 187 ja 845 suhteen
NA14686	G845A homotsygootti	C187G heterotsygootti
NA14690	C187G heterotsygootti	G845A heterotsygootti

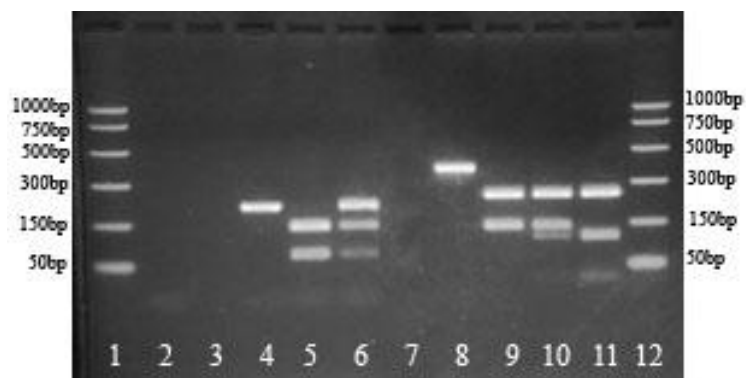
Valitsimme seuraavaan kokeeseen näytteiksi NA14656:n, joka edustaa villityypin DNA:ta HFE-geenin nukleotidien 187 ja 845 suhteen, NA14620:n, joka on G845A homotsygootti ja NA14650:n joka on heterotsygootti sekä C187G:n että G845A:n suhteen. Kokeessa käytetyt reagenssien tilavuudet ja reaktio-olosuhteet säilytimme ensimmäisen koekäytön mukaisina, tehdyt muutokset koskivat DNA-näytteitä ja agarosigeelielektroforeesia. Geelinä käytimme alkuperäisen geelin sijaan aikaisemmassa kokeilussa hyväksittyä todettua 2,5% LE-agarosigeeliä, sekä uutena kokeiluna 2% LE-agarosigeelinä.

Kaivoihin yksi ja kaksitoista latasimme BenchTop-kokostandardia ja kaivoihin kaksi ja kolme negatiiviset kontrollit. Kaivossa neljä näkyy näytteestä NA14656 monistettu villityypin pilkkomaton 208 emäsparin pituinen fragmentti, ja kaivossa viisi saman näytteen *MboI*:llä pilkotut 138 ja 70 emäsparin pituisina näkyvät fragmentit. Kaivossa kuusi on monistettuna C187G/G845A yhdistelmäheterotsygoottinen NA14650-DNA, mikä näkyy geelillä 208, 138 ja 70 emäsparin pituisina fragmentteina *MboI*-digestion jälkeen. Kaivon seitsemän jätimme tyhjäksi, sillä koehetkellä meillä ei ollut käytettävissä C187G homotsygootti-DNA:ta. Jätimme kaivon tyhjäksi tulosten vertailun helpottamiseksi. Kaivoissa kahdeksan ja yhdeksän on käytetty jälleen NA14656 villityypin DNA:ta, joista ensimmäinen on pilkkomaton 390 emäsparin pituinen DNA-jakso ja jälkimmäisessä on sama pilkottuna *RsaI*-entsyymillä 248 ja 142 emäsparin pituisiksi paloiksi. Kaivo kymmenen sisältää näytteestä NA14650 (yhdistelmäheterotsygootti) monistetun 390 emäsparin jakson pilkottuna *RsaI*-entsyymillä 248, 142 ja 113 emäsparin paloiksi. Kaivossa yksitoista, jossa käytettiin G845A-homotsygoottista NA14620-

DNA:ta, on nähtävissä 248, 113 ja 29 emäsparin fragmentit *RsaI*-digestion jälkeen. 29 emäsparin pituinen fragmentti näkyy erittäin himmeästi. (Kuva 6.)



KUVA 6: 2,5% LE-agarooosi. Kaivot 1 ja 12 BenchTop-kokostandardit, kaivo 2 eksonin 2 negatiivinen kontrolli, kaivo 3 eksonin 4 negatiivinen kontrolli, kaivo 4 digestoimaton eksonin 2 wt C187/G845, kaivo 5 *MboI*-digestoitu wt C187/G845, kaivo 6 *MboI*-digestoitu C187G/G845A, kaivo 7 oikean näytteen puuttumisen vuoksi tyhjä, kaivo 8 digestoimaton eksonin 4 wt C187/G845, kaivo 9 *RsaI*-digestoitu wt C187/G845, kaivo 10 *RsaI*-digestoitu C187G/G845A, kaivo 11 G845A/G845A



KUVA 7: 2% LE-agarooosi. Samat näytteet kuin kuvassa 6

7.3 Polymeraasientsyymin vaihto

Koska saimme menetelmän toimimaan hyvin Promega Corporationin reagensseilla, oli meidän mahdollista aloittaa kokeilut käyttäen edullisempia ja Tampereen ammattikorkeakoulun bioanalytiikan ja laboratorioalan koulutusohjelmien harjoitustöissä jo käytettäviä Thermo Scientific PCR-reagensseja. Säilytimme polymeraasiketjureaktion lämpötilat ja ajat Promega Corporationin ohjeen mukaisina. Lähes kaikki reaktioajat ja reaktiolämpötilat sijoittuvat DyNAzymeTMI:lle suositeltuihin vaihteluväleihin (Finnzymes

Oy 2009, 1). Uuteen kokeeseen valitsimme polymeraasientsyymiksi DyNAzymeTM:n sekä valmistajan entsyymille suosittelemat puskurireagenssit ja magnesiumkloridiliuoksen. Kokeessa käytetty dNTP-liuos oli myös Thermo Scientific:in tuottama.

Ensimmäisen kokeen tarkoituksena on testata DyNAzymeTM-entsyymin soveltuvuutta menetelmän polymeraasientsyymiksi. Näyte-DNA:na käytimme ainoastaan C187G/G845A-yhdistelmäheterotsygootti-DNA:ta, jolla on mahdollista saada näkyviin kaikki mutaatioiden osoittamisen kannalta oleelliset fragmentit agarosigeelillä. Entsyymille suositeltu optimaalinen magnesiumkonsentraatio PCR-reaktioseoksessa on 1,5mM, mutta sen menetelmäkohtainen optimiarvo vaihtelee 0,75 ja 4,0 mM:n välillä (Finnzymes 2009, 1). Valmistimme neljä paria mastermix-liuoksia, joihin muuttujaksi valitsimme magnesiumkonsentraation. Optimaalisen magnesiumkonsentraation löytämiseksi kokeilimme eri arvoja suositellun konsentraation ylä- ja alapuolelta. Valitut magnesiumkonsentraatiot olivat 1mM, 1,5mM, 2mM ja 2,5mM. 1,5mM liuos valmistettiin käyttämällä 10X Optimized DyNAzymeTM puskuria, jolloin magnesiumkloridin lisäys ei ole tarpeen. Koska käytimme vain yhtä näyte-DNA:ta, valmistimme mastermix-liuoksia vain 50 µl kutakin.

TAULUKKO 10: Mastermix 1 c(MgCl₂) = 1,5mM

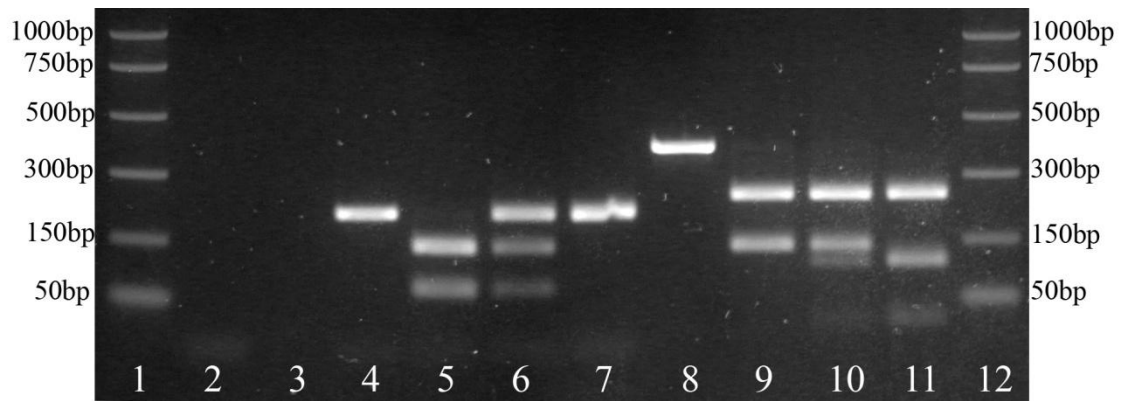
Ainesosat	Tilavuus kahdelle reaktiolle	Konsentraatio tai aktiivisuus /PCR -reaktioseos
Eksonin 2 aluke 1	1 µl	0,5 pmol/µl
Eksonin 2 aluke 2	1 µl	0,5 pmol/µl
10X Optimized DyNAzyme TM -puskuri	10 µl	1X
dNTP liuos	2 µl	200 µM
DyNAzyme TM polymeraasi	1,25 µl	1,25U
Nukleaasivapaa vesi	34,75 µl	-
Lopputilavuus	50 µl	-

TAULUKKO 11: Mastermix 2 c(MgCl₂) = 1,5mM

Ainesosat	Tilavuus kymmenelle reaktiolle	Konsentraatio tai aktiivisuus /PCR -reaktioseos
Eksonin 4 aluke 1	1 µl	0,5 pmol/µl
Eksonin 4 aluke 2	1 µl	0,5 pmol/µl
10X Optimized DyNAzyme™ -puskuri	10 µl	1X
dNTP liuos	2 µl	200 µM
DyNAzyme™I poly-meraasi	1,25 µl	1,25U
Nukleaasivapaa vesi	34,75 µl	-
Lopputilavuus	50 µl	-

Muissa liuoksissa käytettiin Finnzymes:n Mg²⁺-free DyNAzyme™ -puskuria ja 50mM magnesiumiumkloridiliuosta, jolloin veden määrää vähennettiin oikean tilavuuden saavuttamiseksi. 1,0mM liuos saavutettiin lisäämällä 2 µl MgCl₂-liuosta, 2,0mM:aan sitä lisättiin 4 µl ja 2,5mM:aan 5 µl. Jokaisen mastermix:n osalta tehtiin näytteen suhteen negatiiviset kontrollit sekä C187G/G845A-heterotsygoottinäytteen HFE-geenin eksonien 2 ja 4 monistukset. Digestio tehtiin *Mbo*I- ja *Rsa*I-restriktioentsyymeillä alkuperäisen ohjeen mukaisesti, ja elektroforeesissa käytimme 2% LE-agarosigeeliä. Oikeat DNA-jaksot olivat monistuneet kaikilla eri magnesiumiumkonsentraatioilla ja konsentraatioerot toivat pieniä muutoksia fragmenttien näkyvyyteen agarosigeelillä. Tulosten tulkintaa vaikeutti jokaisella kaivolinjalla näkyvä aluketausta.

Saatuamme käyttöömme aiemmin puuttuneen C187G-homotsygootti-DNA:n, teimme vielä yhden koekäytön jolla varmistimme menetelmän toimivuuden kaikilla mutaatiotyypeillä. PCR-syklitystä, reagenssikonsentraatioita tai reaktioaikoja ei muutettu edellisissä kokeissa käytetyistä. Hylkäsimme ajatuksen polymeerasientsyymien vaihdosta vaikeasti tulkittavien tulosten vuoksi ja palasimme käyttämään Promega GoTaq® Hot Start DNA polymeerasia. Tämä koekäyttö tuotti halutunlaiset fragmentit kaikilla näytteillä. Myös kuvan 8 (sivu 41) kaivossa seitsemän oleva C187G-mutaationäyte tuotti oikeanlaisen, pilkkoutumattoman fragmentin elektroforeesissa.



KUVA 8: HFE-geenin eksonien 2 ja 4 monistus- ja digestiotuotteet. Kaivot 1 ja 12 BenchTop-kokostandardit, kaivo 2 eksonin 2 negatiivinen kontrolli, kaivo 3 eksonin 4 negatiivinen kontrolli, kaivo 4 digestoimaton eksonin 2 wt C187, kaivo 5 *Mbo*I-digestoitu wt C187, kaivo 6 *Mbo*I-digestoitu C187/C187G, kaivo 7 C187G/C187G, kaivo 8 digestoimaton eksonin 4 wt G845, kaivo 9 *Rsa*I-digestoitu wt G845, kaivo 10 *Rsa*I-digestoitu G845/G845A, kaivo 11 G845A/G845A

8 TUOTOKSEN KUVAUS

Opinnäytetyömme tuotoksena teimme kokeellisen osuuden aikana saamiemme tulosten pohjalta toimivan työohjeen HFE-geenin mutaatioiden osoittamiseksi. Työohjeen teossa huomioimme lääketieteellisten laboratorioiden laatustandardin SFS-EN ISO 15189 ja testaus- ja kalibrointilaboratorioiden pätevyyden yleisiä vaatimuksia käsittelevän standardin ISO/IEC 17025 vaatimukset. Työohjeen ulkoasun mallina käytimme Laboratoriokeskuksen formaattia, jota on hyödynnetty aiemminkin koulumme työohjeissa.

Lääketieteellisten laboratorioiden laatustandardin SFS-EN ISO 15189 mukaan työohjeessa tulee olla selkeästi ilmaistuna ainakin: tutkimuksen tarkoitus, tutkimusmenetelmän periaate, näytetyyppi, tarvittavat laitteet ja reagenssit, menettelyn vaiheet, menetelmän kontrollit, virhelähteet, varotoimenpiteet ja ohjeet tulosten tulkintaan (Suomen standardisoimisliitto 2007, 48). Lisäksi työohjeessa tulee näkyä dokumentin valmistus- ja/tai hyväksymispäivämäärä, sivunumerot, sivujen kokonaismäärä ja hyväksyjä (International organization for standardization 2004, 5).

Lopulliseen työohjeeseen korjasimme mastermix:ien komponenttien keskinäiset suhteet loogisemmiksi ja tällä tavalla reaktiot saatiin tuottamaan oikean pituisia DNA-jaksoja. Saatuaamme oikeita mutaatioita sisältävät näytteet käyttöömme, tulokset olivat kaikkien reaktioiden osalta oikeat. Työohjeen PCR-alukkeet tilattiin Sigma-Aldrich:n Custom Oligos -mittatilauspalvelusta. Alukesekvenssit saatiin Promega Corporationin työohjeesta (2008, 9). Kunkin alukkeen konsentraatio omassa putkessaan on 50µM.

TAULUKKO 12: Alukesekvenssit

Eksoni	Alukesekvenssit
2	5' ACATGGTTAAGGCCTGTTGC 3' 5' GCCACATCTGGCTTGAAATT 3'
4	5' TGGCAAGGGTAAACAGATCC 3' 5' CTCAGGCACTCCTCTCAACC 3'

Työohjeessa käytettäväksi polymeerasientsyymiksi valitsimme Promega Corporationin tuottaman GoTaq® Hot Start DNA polymeerasin. Vaihtoehtona kokeillulla DyNAzyme™I polymeerasilla ongelmaksi muodostui voimakas aluketausta, joka häiritsi tulosten tulkintaa. Promegan polymeerasin mukana toimitetaan sille optimoidut PCR-

puskurit sekä magnesiumkloridiliuos. Työssä voidaan käyttää dNTP-liuoksena esimerkiksi Promega:n, Fermentas:in tai Finnzymes:in valmistamia liuoksia, joiden konsentraatio on 10mM.

Digestioon valitsimme käytettäväksi Fermentas:lta tilatut *MboI*- ja *RsaI*-restriktoentsyymit, jotka pilkkoivat DNA-jaksot hyvin ohjeen mukaisessa kolmessa tunnissa. Näiden entsyymien käyttö työohjeessa on mielestämme järkevää, sillä digestiolämpötila on molemmilla sama, toisin kuin vaihtoehtoisina entsyymeinä testatuilla *CviQI*:llä ja *BcI*:llä. Pilkkomatonta kontrollia päätimme sisällyttää digestiovaiheeseen 10 µl, jolloin siitä on helpompi pipetoida geelille 8 µl.

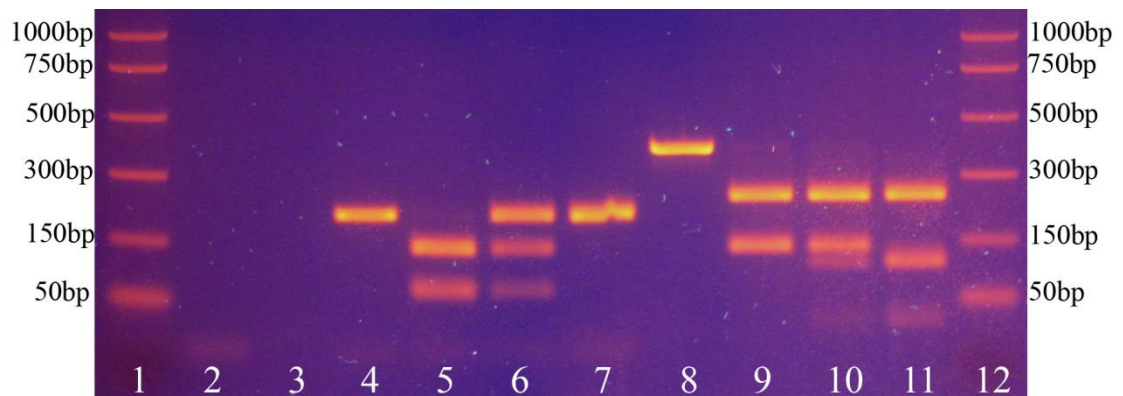
Agaroosigeelielektroforeesiin teimme muutoksia, jotka helpottavat harjoitustyön tekemistä ja tuovat säästöjä. Geeliksi valitsimme 2% LE-agaroosin. Kokeessa käytimme Rochen valmistamaa agaroosia, jota Tampereen Ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman opiskelijat käyttävät muissakin harjoitustöissä. Vaihtoehtona Rochen agaroosille voisi olla esimerkiksi edullinen GellyPhor ®LE-agaroosi. AGE:n kokostandardina käytimme Promega Corporationin valmistamaa BenchTop PCR-kokostandardia. Alkuperäinen työohje kehottaa käyttämään kokostandardia 12 µl, mutta tämän omassa ohjelehtisessä ilmoitettu vaadittava määrä on 6 µl. Kuuden µl:n käyttäminen antoi fragmenteille yhtä hyvän intensiteetin kuin 12 µl:n, joten säästösyistä vähensimme määrän lopulliseen työohjeeseen. Geelin kaivoihin pipetoitavien digestiotuotteiden tilavuuden säilytimme 12 µl:ssa ja pilkkomattomien PCR-tuotteiden 8 µl:ssa. Elektroforeesin jännitteeksi valitsimme 6V/cm geeliä, joka käyttämässämme 26cm:n kammiossa tarkoittaa 156V:a. Elektroforeesi kesti yhden tunnin kyseisellä jännitteellä. Työohjeeseen valitsimme kuvan, jossa näkyvät kaikki mahdolliset mutaatiotyypit. Kuvassa 9 (sivu 44) käytimme taulukon 13 mukaisia DNA-näytteitä ja fragmenttien merkityksen selvitimme kuvan yhteydessä.

TAULUKKO 13: Työssä käytettävät DNA-näytteet

Näyttenumero	Mutaatio
NA13591	C187G homotsygootti
NA14620	G845A homotsygootti
NA14650	C187G/G845A yhdistelmäheterotsygootti
NA14656	Villityyppi nukleotidien 187 ja 845 suhteen
NA14686	C187G heterotsygootti

TAULUKKO 14: Eksonien 2 ja 4 mutaatiot kuvassa 9.

Kaivo	Näyte	Mutaatio ja digestiotuotteiden koot
1	BenchTop kokostandardi (1kb ladder)	-
2	Eksonin 2 negatiivinen kontrolli	-
3	Eksonin 4 negatiivinen kontrolli	-
4	Eksonin 2 pilkkomaton kontrolli	villityyppi C187, 208bp
5	Eksonin 2 <i>Mbo</i> I-digestio	villityyppi C187, 138bp ja 70bp
6	Eksonin 2 <i>Mbo</i> I-digestio	heterotsygootti C187/C187G, 208bp, 138bp ja 70bp
7	Eksonin 2 <i>Mbo</i> I-digestio	homotsygootti C187G/C187G, 208bp
8	Eksonin 4 pilkkomaton kontrolli	villityyppi G845, 390bp
9	Eksonin 4 <i>Rsa</i> I-digestio	villityyppi G845, 248bp ja 142bp
10	Eksonin 4 <i>Rsa</i> I-digestio	heterotsygootti G845/G845A, 248bp, 142bp, 113bp ja 29bp
11	Eksonin 4 <i>Rsa</i> I-digestio	homotsygootti G845A/G845A, 248bp, 113bp ja 29bp
12	BenchTop kokostandardi (1kb ladder)	-



Kuva 9: HFE-geenin eksonien 2 ja 4 monistus- ja digestiotuotteet. Samat näytteet kuin kuvassa 8 sivulla 41

9 POHDINTA

Valitsimme hemokromatoosia aiheuttavia mutaatioita koskevan aiheen, koska olemme kiinnostuneita genetiikan sovelluksista ja työ tarjosi mahdollisuuden tutustua joihinkin molekyylibiologian perusmenetelmiin syvemmin. Perinnöllinen hemokromatoosi oli tautina meille vieras ja siihen syventyminen toi työhömmе sopivasti haastetta, joka edesauttoi ammatillista kasvuamme. Tutustuimme perinnöllisen hemokromatoosin ja opinnäytetyössä käytettyjen työmenetelmien teoriaan monipuolisesti. Haimme tietoa lukuisista kansainvälisistä kirja- ja artikkelilähteistä ja valikoimme niistä viimeisimmät, joiden luotettavuutta arvioimme vertailemalla niiden sisältöjä keskenään.

Opinnäytetyömme on toiminnallinen siihen kuuluvan kokeellisen osuuden vuoksi. Kokeellisen osuuden aluksi koekäytimme valmiin HFE-geenin mutaatioiden osoittamiseen tarkoitetun menetelmän. Koekäytön aikana tekemämme havainnot dokumentoimme yksityiskohtaisesti tutkimuspäiväkirjaan ja suunnittelimme tutkimusprotokollan muutoksia. Muutosten suunnittelussa käytimme apuna laatimaamme teoreettista viitekehystä, johon olimme koonneet menetelmäoptimoinnin kannalta keskeistä tietoa hemokromatoosista ja siihen liittyvien mutaatioiden osoittamisesta. Teimme useita koekierroksia, joiden aikana kerättyjen tietojen avulla saimme laadittua toimivan menetelmäkokoaisuuden. Kokeellinen osuus opinnäytetyössämme oli haasteellinen monista eri syistä. Alkuperäinen työohje oli englanninkielinen, joten jouduimme koeasetelmaa suunniteltaessa kääntämään ohjeen ensin suomeksi. Tämän lisäksi laskimme ja tarkistimme reaktioseosten konsentraatiot kunkin reagenssin suhteen kirjallisuuden avulla ja pääättelemällä. Kokeellisen osuuden aikana kontrolloimme jatkotoimenpiteitä aiheuttaneet tulokset uusilla kokeilla. Tulosten toistettavuuden ja oikeiden kontrollitulosten voidaan ajatella sulkevan pois pipetointivirheiden ja kontaminaation mahdollisuuden.

Kokeellisen osuuden aikana ilmaantui joitakin odottamattomia ongelmia, jotka hidastivat tutkimusprosessia. Ensimmäiseen kokeeseen tekemiemme reagenssien tilavuusmuutosten ansiosta menetelmä toimi kohtalaisesti, mutta näytteiden tuottamat fragmentit eivät vastanneet odotuksia mutaatioiden osalta. Tämä ongelma toistui seuraavissa kokeissa, joiden aikana saimme kuitenkin paranneltua agaroosigeelielektroforeesia. Menetelmän optimoinnissa läpimurto tapahtui, kun ajattelimme ongelmien johtuvan näytteistä, eikä niinkään tekijöiden tai työohjeen virheistä. Tarkistimme näytenumeron perus-

teella DNA-näytteiden mutaatiot tuottajan tuotetiedoista, jolloin selvisi että käytössämme olleet näytteet eivät sisältäneet kaikkia kokeessa tarvittuja mutaatioita. Saatuamme oikeat näytteet käyttöömmme, alkoi optimointi tuottaa tuloksia, joita pystyimme hyödyntämään työohjeen laadinnassa.

Laatimamme työohje on suomenkielinen sekä sisällöltään ja ulkoasultaan käyttäjäystävällinen, mikä helpottaa sen käyttöä harjoitustöissä. Ulkoasu on myös yhteneväinen muiden bioanalytiikan koulutusohjelman harjoitustyöohjeiden kanssa. Uudessa työohjeessa reagenssien konsentraatiot reaktioseoksissa on tarkistettu ja ylimääräisiä kuluja on mahdollisuuksien mukaan minimoitu. Reagenssikuluissa säästöjä tuovat elektrofooresissa käytettävän agarosin pienempi määrä sekä PCR-kokostandardin pienempi pipetointitilavuus. Polymeraasientsyymin vaihdolla muissa harjoitustöissä käytettävään DyNAzymeTMI:een olisi voitu saavuttaa säästöä, mutta kokeemme osoittivat, että sen käyttö tässä työssä ei ole mahdollista. Menetelmä voi vaatia toimiakseen hotstart-polymeraasin käyttöä, jolloin alukedimeerien muodostuminen on mahdollisesti vähäisempää.

Kun saimme opinnäytetyön toimeksiannon, ajattelimme että opiskelijat voisivat käyttää harjoitustyössä omia DNA-näytteitään. Euroopan neuvoston biolääketiedesopimus kuitenkin rajoittaa geenitestien tekemistä laboratorioissa, joilla ei ole valmiuksia tarjota asianmukaista geneettistä neuvontaa positiivisen tuloksen saaneelle henkilölle.

Testejä, joilla voidaan ennustaa perinnöllisiä sairauksia tai selvittää, onko henkilöllä jonkin sairauden aiheuttava geeni tai geneettinen taipumus tai alttius sairastua, saa suorittaa vain terveydellistä tarkoitusta tai terveyteen liittyvää tieteellistä tutkimusta varten, ja testaukseen tulee liittyä asianmukaista geneettistä neuvontaa (Yleissopimus ihmisoikeuksien ja ihmisarvon suojaamiseksi biologian ja lääketieteen alalla 2010).

Opiskelijoiden omien näytteiden käyttäminen olisi voinut lisätä opiskelijoiden motivaatiota kokeen tarkkaan suorittamiseen. Laillisten ongelmien lisäksi omien näytteiden käyttäminen kuitenkin olisi herättänyt eettisiä kysymyksiä: Saavatko muut opiskelijat nähdä tulokset? Voidaanko positiiviseen tulokseen luottaa, vai tuleeko se kontrolloida kliinisessä laboratoriossa?

Opinnäytetyömme on valmistunut tiiviin yhteistyön tuloksena mikä on kehittänyt oman ja ryhmän toiminnan kriittistä tarkastelua. Kokeellinen osuus kehitti bioanalytiikan

työssä vaadittavaa tarkkuutta ja tulosten laadunarviointitaitoa. Erityisesti kehityimme tärkeiden molekyylibiologian menetelmien, PCR:n, RFLP:n ja AGE:n perusteiden tuntemisessa ja suorittamisessa. Yhteistyömme sujui hyvin koko opinnäytetyöprosessin ajan sekä keskenämme että ohjaavien opettajiemme kanssa.

Tutkimusprosessin aikana ilmeni joitakin ongelmia, joihin emme ehtineet tämän opinnäytetyön puitteissa puuttumaan. Nämä ongelmat voidaan nähdä myös mahdollisina jatkotutkimusaiheina. Menetelmää voisi kehittää edelleen kokeilemalla laatimassamme työohjeessa muita, mahdollisesti edullisempia hotstart-polymeraaseja. Samalla olisi mahdollista kokeilla lyhyempiä restriktioentsyymidigestioaikoja.

LÄHTEET

Aguilar-Martinez, P., Grandchamp, B., Cunat, S., Cadet, E., Blanc, F., Nourrit, M., Lassoued, K., Schved, J-F & Rochette, J. 2011. Ferrata Storti Foundation. Haematologica: The Hematology Journal. Iron overload in *HFE* C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare *HFE* variants. Julkaistu 12.1.2011. Luettu 25.8.2011.

<http://www.haematologica.org/cgi/content/full/96/4/507#F10960507>.

Alexander, J & Kowdley, K. 2005. Annals Of Hepatology. Hereditary Hemochromatosis: Genetics, Pathogenesis, and Clinical Management. Luettu 17.8.2011.

<http://www.annalsofhepatology.com/PDF/vol4n4/Hp054-02.pdf>.

Barton, J & Edwards, C. 2000. Hemochromatosis. Genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. Cambridge: Cambridge University Press 2000.

Camaschella, C. & Roetto, A. 2005. National Center for Biotechnology Information. Tfr2-Related Hereditary Hemochromatosis. Päivitetty 9.6.2011. Luettu 16.8.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1349/>.

Campbell, M. & Farrell, S. 2008. Biochemistry. Kuudes painos. Belmont, Kalifornia: Brooks/Cole.

Coriell Institute for Medical Research. 2009. Diseases Sample List. Hemochromatosis; HFE. Luettu 12.4.2011.

<http://ccr.coriell.org/Sections/BrowseCatalog/DiseaseDetail.aspx?PgId=403&omim=HEM14160&coll=>.

Duodecim terveyskirjasto. 2011. Desferal. Luettu 31.8.2011.

http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=far11445&p_teos=far&p_osio=&p_selaus=51700.

Finnzymes Oy. 2009. DyNAzyme™ DNA Polymerase Kit. Ohjelehti. Versio 1.4. Tulostettu 15.4.2011.

http://www.finnzymes.fi/pdf/dynazyme1_dnapolymerase_kit_f550_1_4_low.pdf.

Glick, B., Patten, C. & Pasternak, J. 2010. Molecular Biotechnology : Principles and Applications of Recombinant DNA. Neljäs painos. Washington: ASM Press.

Goldberg, P. 2005. Juvenile Hereditary Hemochromatosis. Center for Biotechnology Information. Luettu 17.8.2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1170/>.

Hannuksela, J., Färkkilä, M. & Parkkila, S. 2008. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Perinnöllinen hemokromatoosi. 2008; 124: 1019–1027. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Heikkinen, H. 2006. Toimintatutkimuksen lähtökohdat. Teoksessa Heikkinen, H., Rovio, E. & Syrjälä, L. (toim.) Toiminnasta tietoon – Toimintatutkimuksen menetelmät ja lähestymistavat. Helsinki: Kansanvalistusseura.

Heikkinen, H., Rovio, E. & Kiilakoski, T. 2006. Toimintatutkimus prosessina. Teoksessa Heikkinen, H., Rovio, E. & Syrjälä, L. (toim.) Toiminnasta tietoon - Toimintatutkimuksen menetelmät ja lähestymistavat. Helsinki: Kansanvalistusseura.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Huovinen, T. & Rovio, E. 2006. Toimintatutkija kentällä. Teoksessa Heikkinen, H., Rovio, E. & Syrjälä, L. (toim.) Toiminnasta tietoon – Toimintatutkimuksen menetelmät ja lähestymistavat. Helsinki: Kansanvalistusseura.

International organization for standardization. 2004. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneve: International organization for standardization.

Kaplan, L & Pesce, A. 2010. Clinical Chemistry. Theory, analysis, Correlation. 5. painos. St.Louis, Missouri: Mosby Elsevier.

Killeen, A. (edit.) 2001. Molecular Pathology Protocols. New Jersey: Humana Press.

Laboratoriokeskus ohjekirja. 2006. Hemokromatoosi, DNA-tutkimus. Versio 1.1. Luettu 14.4.2011.

http://www.laboratorio.fi/lake/laboratoriotutkimukset/nayta.tmp? sivu_id=166;id=2102;talleta_url=1.

Laboratoriokeskus ohjekirja. 2008. Rauta. Versio 1.1. Luettu 15.8.2011.

http://www.laboratorio.fi/lake/laboratoriotutkimukset/nayta.tmp? sivu_id=166;id=2944;talleta_url=1.

Marshall, W & Bangert, S. 2004. Clinical Chemistry. 5. painos. USA: Mosby.

Mustajoki, P. 2009. Hemokromatoosi (Raudankertymäsairaus). Lääkärikirja Duodecim. Luettu 1.9.2011.

http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00758&p_teos=dlk&p_osio=&p_selaus=.

NCBI. 2011. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Luettu 18.8.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>.

New England Biolabs 2007. Catalog & Technical Reference. USA.

Parkkila, S. 2004. Terapia Fennica. Hemokromatoosi. Luettu 17.8.2011.

<http://www.terapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Hemokromatoosi>.

Promega Corporation. 2008. Detecting HFE Mutations in Human Genomic DNA: Instructor's Manual. Työohje. Tulostettu 2.9.2010. Wisconsin, USA: Promega Corporation.

<http://www.promega.com/~media/files/resources/education%20and%20training/unit%202/unit2instructorsmanual.ashx?la=en>.

- Promega Corporation. 2011a. Agarose, LMP, Preparative Grade for Small Fragments (10 to 1,000bp). Luettu 16.8.2011.
http://www.promega.com/products/biochemicals-and-labware/biochemical-buffers-and-reagents/agarose_-lmp_-preparative-grade-for-small-fragments-_10-to-1_000bp_/.
- Promega Corporation. 2011b. GoTaq® Hot Start Polymerase. Luettu 18.8.2011.
<http://www.promega.com/products/pcr/hot-start-pcr/gotaq-hot-start-polymerase/>.
- Promega Corporation. 2011c. Restriction Enzymes: *RsaI*. Luettu 12.4.2011.
<http://www.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/restriction-enzymes/Rsai/>.
- Rice, G. 2011. Polymerase Chain Reaction: PCR. Päivitetty 5.8.2011. Luettu 17.8.2011.
http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html.
- Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) 2007. Veritaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Sheehan, D. 2009. Physical Biochemistry – Principles and Applications. 2. painos. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Suomen standardisoimisliitto. 2007. SFS-EN ISO 15189. Lääketieteelliset laboratoriot. Erityisvaatimukset laadulle ja pätevyydelle. 2. painos. Helsinki: Suomen standardisoimisliitto.
- Suominen, I. & Ollikka, P. 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- U.S. National Library of Medicine. 2009. Genes: HFE. Julkaistu 15.8.2011. Luettu 17.8.2011.
<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HFE>.
- Vilkka, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Voutilainen, E. 2009. Helsingin yliopiston avoin yliopisto. Ravintoaineet ja energia. Luettu 5.9.2011.
http://www.avoin.helsinki.fi/oppimateriaalit/ravitsemustieteen_perusteet/Rav_ravaineet_energia_0909.pdf.
- Whittington, C. 2011. Ironic Health. Type 4 Hemochromatosis – What is it?. Luettu 18.8.2011.
<http://ironic-health.com/articles-of-interest-on-hemochromatosis/type-2-hemochromatosis-or-ferroportin-disease-articles/type-4-hemochromatosis/>.
- Williams, R., Kline, M. & Smith, R. 1996. BSA and Restriction Enzyme Digestions. Promega Notes Magazine 59, 46–48.
- Wilson, K. & Walker, J. 2005. Biochemistry and Molecular Biology. Kuudes painos. New York: Cambridge University Press.

Yleissopimus ihmisoikeuksien ja ihmisarvon suojaamiseksi biologian ja lääketieteen alalla. 1.3.2010. SopS 24/2010.
<http://www.finlex.fi/fi/sopimukset/sopsteksti/2010/20100024>.

TUTKIMUS	HFE-GEENIN G845A- JA C187G -MUTAATIOIDEN OSOITUS
INDIKAATIOT	Perinnöllisen hemokromatoosin diagnostiikka.
MENETELMÄ	Polymeraasiketjureaktioon ja restriktioentsyymianalyysiin perustuva DNA-tutkimus.
JOHDANTO	Perinnöllinen hemokromatoosi on rauta-aineenvaihdunnan häiriö, jossa elimistöön varastoituu rautaa moninkertaisesti normaaliin verrattuna. Useimmiten se johtuu autosomaalisesti periytyvistä HFE-geenin mutaatioista, jotka johtavat HFE-proteiinin konformaatiomuutoksen valityksellä raudan liialliseen imeytymiseen suolistossa. Yleisimmät tautia aiheuttavat mutaatiot ovat C282Y/C282Y –homotsygotia, ja C282Y/H63D -yhdistelmäheterotsygotia. H63D-mutaatiossa sytosiini on vaihtunut guaniiniksi nukleotidissa 187 (C187G), C282Y-mutaatiossa guaniini on vaihtunut adeniiniksi nukleotidissa 845 (G845A). Myös muiden mutaatiotyyppien on havaittu altistavan hemokromatoosille.
PERIAATE	Menetelmän ensimmäinen vaihe on polymeraasiketjureaktio (PCR), joka monistaa HFE-geenin eksonit kaksi ja neljä joilla mahdolliset mutaatiot sijaitsevat. Monistustuotteet pilkotaan mutaatioalueelta restriktioendonukleaaaseilla, jolloin mutaatiosta riippuen restriktioentsyymille on muodostunut tai siltä on kadonnut tunnistuskohta. Lopuksi restriktiotuotteiden pituuspolymorfia-analyysi (RFLP) suoritetaan agarosegeelelektroforeesilla (AGE). Restriktiofragmenttien lukumäärän ja pituuk-sien perusteella arvioidaan mutaatioiden olemassaolo, sekä hetero-, ja homotsygotia.
NÄYTE	Näyttemateriaalina käytetään eristettyä genomista DNA:ta, joka voidaan tilata kaupallisesti, tai se voidaan eristää itse potilas-näytteistä.
VÄLINEET	<u>PCR ja digestio</u> PCR-laite lämpökannella Koeputkisekoittaja Mikrosentrifuugi Ilmamäntäpipettejä (0,3-3µl, 1-10µl, 5-50µl ja 20-200µl) Esisteriloituja suodatinkärkiä, 10 µl ja 100 µl Steriloituja Eppendorf-putkia, 0,5 ml ja 1,5 ml Jäähaude

LIITE 1

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
BIOANALYTIKAN KOULUTUSOHJELMA
SOLU- JA MOLEKYYLIBIOLOGIA

Laatineet Paavo Hannus ja Juha Tasso

Hyväksynyt MM & TV 26.10.2011

2/6

AGE

Geelielektroforeesilaite
Elektroforeesivoimanlähde
UV-valopöytä ja kamera
2000 ml mittapullo, 100ml mittalasi, 250ml erlenmeyerkolvi
Ilmamäntäpipettejä (1-10 µl ja 5-50 µl)
Pipetinkärkiä
Mikroaaltouuni
Lämpömittari (0-100°C)
Analyysivaaka
Lusikka

REAGENSITPCR

Eksonin 2 alukkeita 1 ja 2 (50pmol/µl)
Eksonin 4 alukkeita 1 ja 2 (50pmol/µl)
GoTaq® Hot Start DNA Polymeraasi (5U/µl) (Promega)
5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega)
MgCl₂ -liuos (25mM) (Promega)
dNTP -liuos (10 mM)
DNA-näyte (50ng/ µl)
Nukleasivapaa vesi

Digestio

*Mbo*I restriktioendonukleaasi (10U/µl) (Promega)
*Rsa*I restriktioendonukleaasi (10U/µl) (Promega)
10X puskuri C

AGE

Agaroosi LE (Roche)
1X TAE-puskuri
Etidiumbromidiliuos (10mg/ml)
PCR-kokostandardi (50-1000bp)
Laboratoriopuhdas vesi

TURVATOIMET

Etidiumbromidi on karsinogeeninen aine ja sen käsittelyssä tulee käyttää suojakäsineitä. Etidiumbromidia sisältävä jäte tulee hävittää asianmukaisesti. Ultraviolettil valo on haitallista silmille ja iholle ja siltä on suojauduttava geelin tarkastelun aikana.

SUORITUSPCR

1. Ennen käyttöä sulata, sekoita ja sentrifugoi lyhyesti kaikki reagenssit paitsi polymeerasientsyymi. Aseta aineet jäähähteelle.
2. Merkitse kaksi 0,5ml:n eppendorffputkea eksonien numeroilla ja omalla tunnuksella.

3. Valmista mastermix 1- ja 2 -liuokset seuraavien taulukoiden mukaan. Huomioi myös taulukon pipetointijärjestys. Sekoita ja sentrifugoi lyhyesti liuokset. Valmista mastermix-liuoksia oikea määrä huomioiden ryhmän koko, kontrollit (yksi molempia/ryhmä) ja pipetointivirheiden mahdollisuus.

Mastermix 1	Tilavuus yhdelle reaktiolle
Nukleaasivapaa vesi	7,55 µl
5X Green GoTaq® Flexi Buffer	10 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTP	1 µl
Eksonin 2 aluke 1	0,5 µl
Eksonin 2 aluke 2	0,5 µl
GoTaq® Hot Start DNA Polymeraasi	0,25 µl
Lopputilavuus	25 µl

Mastermix 2	Tilavuus yhdelle reaktiolle
Nukleaasivapaa vesi	7,55 µl
5X Green GoTaq® Flexi Buffer	10 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTP	1 µl
Eksonin 4 aluke 1	0,5 µl
Eksonin 4 aluke 2	0,5 µl
GoTaq® Hot Start DNA Polymeraasi	0,25 µl
Lopputilavuus	25 µl

Valmista PCR-seokset seuraavan taulukon mukaan 0,5ml:n eppendorffputkiin, sekoita ja sentrifugoi lyhyesti. Säilytä kaikkia aineita jäähauteella.

Tunniste	Nukleaasivapaa vesi	DNA-näyte	Mastermix 1	Mastermix 2
neg. kontr.	25 µl	-	25 µl	-
neg. kontr.	25 µl	-	-	25 µl
1 (eksoni 2)	25 µl	1,0 µl	25 µl	-
2 (eksoni 4)	25 µl	1,0 µl	-	25 µl

LIITE 1

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
BIOANALYTIKAN KOULUTUSOHJELMA
SOLU- JA MOLEKYYLIBIOLOGIA

Laatineet Paavo Hannus ja Juha Tasso
Hyväksynyt MM & TV 26.10.2011

4/6

4. Siirrä reaktioputket lämpökannelliseen termosykleriin ja suorita monistus seuraavan ohjelman mukaan. Syklityksen jälkeen näytteet voi pakastaa (-18°C) tai siirtää digestio-vaiheeseen.

Toiminto		Lämpötila	Aika
Alkudenaturaatio		95°C	2 min
35 sykliä	Denaturaatio	94°C	30 sek
	Annealing	60°C	30 sek
	Ekstensio	72°C	30 sek
Loppuekstensio		68°C	7 min
Lopetus		4°C	∞

Digestio

1. Merkitse neljä 0,5ml:n eppendorffputkea niin että tunnistat omasi ja tiedät putkien sisällön.
2. Lisää PCR-tuotteet ja reagenssit putkiin seuraavan taulukon mukaan. Ryhmä valmistaa yhteisesti negatiiviset digestioseokset. Sekoita ja sentrifugoi lyhyesti putket.

Reaktioseos	PCR-tuote	PCR-tuotteen tilavuus	10X Buffer C	<i>Mbo</i> I	<i>Rsa</i> I
Dneg.2	neg. (eksoni 2)	26 µl	3 µl	1 µl	-
Dneg.4	neg. (eksoni 4)	26 µl	3 µl	-	1 µl
D1	1 (eksoni 2)	10 µl	-	-	-
D2	1 (eksoni 2)	26 µl	3 µl	1 µl	-
D3	2 (eksoni 4)	10 µl	-	-	-
D4	2 (eksoni 4)	26 µl	3 µl	-	1 µl

3. Inkuboi reaktioputkia +37°C:ssa kolme tuntia. Käytä inkubointiin PCR-laitetta, vesihaudetta tai lämpökaappia.

AGE

1. Valmista 100ml 2% LE-agarosii 1X TAE-puskuriin.
 - Punnitse 2,0 grammaa LE-agarosia 250ml:n erlenmayerkolviin.
 - Lisää erlenmayerkolviin 100ml 1X TAE-puskuria.
 - Lämmitä erlenmayerkolvia mikroaaltouunissa välillä sekoittaen kunnes agarosii on täysin liuennut.
 - Jäähdytä erlenmayerkolvia vesihanan alla kunnes geelin lämpötila on noin 60°C.
 - Lisää nopeasti 5 µl etidiumbromidia (10mg/ml), sekoita ja kaada geeli kelkkaan.
 - Poista ilmakuplat ja lisää kammat. Anna geelin jähmettyä 30-45 minuuttia.
2. Poista kammat, siirrä kelkka ja geeli ajoaltaaseen. Täytä allas 1X TAE-puskurilla, niin että geelin pinta peittyy.
3. Lataa geelille negatiivisia kontrolleja ja digestiotuotteita 12 µl, pilkkomattomia kontrolleja 8 µl ja näyterivien päihin PCR-kokostandardia valmistajan suosittelema määrä (BenchTop-marker 6 µl).
4. Kytke elektroforeesilaitteisto virtalähteeseen ja suorita elektroforeesiajo jännitteellä 6V/cm. Aja näytteitä kunnes Flexi Bufferin keltainen väri on 5mm:n etäisyydellä toisesta kaivolinjasta.
5. Tarkastele geeliä UV-valossa.

KONTROLLIT

Negatiivisina kontrolleina PCR:ssa reaktioseokset ilman templateja. Digestiossa PCR-tuotteet ilman restriktioendonukleaaseja.

VIRHELÄHTEET

Epäspesifiset monistustuotteet:
Liuosten DNA-kontaminaatio

Matala saanto:

Pipetointivirheet, termosyklerin väärä ohjelmointi, vanhentuneet tai väärin käsitellyt reagenssit.

TULKINTA

Kaivoissa yksi ja kaksitoista näkyvät BenchTop -kokostandardit, jonka fragmentit ovat kooltaan 1000, 750, 500, 300, 150 ja 50 emäsparia. Kaivoissa kaksi ja kolme ei näy fragmentteja, koska niissä ovat negatiiviset kontrollit. Eksonin 2 monistustuotteet ovat kooltaan 208bp. Villityypin DNA:ssa on yksi tunnistuskohta *MboI*-entsyymille, jolloin muodostuvien fragmenttien pituudet ovat 138bp ja 70bp. C187G-pistemutaatiossa tunnistuskohta on hävinnyt, jolloin nähtävissä on vain yksi fragmentti.

LIITE 1

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
BIOANALYTIIKAN KOULUTUSOHJELMA
SOLU- JA MOLEKYYLIBIOLOGIA

Laatineet Paavo Hannus ja Juha Tasso
Hyväksynyt MM & TV 26.10.2011

6/6

Eksonin 4 monistustuotteet ovat kooltaan 390bp. Villityypin DNA:ssa on yksi tunnistuskohta *RsaI*-entsyymille, jolloin muodostuvat fragmentit ovat kooltaan 248bp ja 142bp. G845A-pistemutaatio muodostaa toisen tunnistuskohdan *RsaI*:lle, jolloin syntyvät fragmentit ovat kooltaan 248bp, 113bp ja 29bp.

Huomioi erot myös mutaatioiden homotsygootti- ja heterotsygoottimuodoilla.

